

PCT/JP 98/02148

15.05.98

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 17 JUL 1998

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1997年 5月15日

出 願 番 号  
Application Number:

✓ 平成 9年特許願第126113号

出 願 人  
Applicant(s):

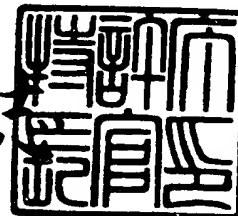
協和醗酵工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 7月 3日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

山 建 佐 平



出証番号 出証特平10-3048845

【書類名】 特許願

【整理番号】 H08-1171K6

【提出日】 平成 9年 5月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/12  
C07K 7/00

【発明の名称】 変異 P 5 3 蛋白質の転写活性を復活させる環状構造  
を持つペプチド

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市麻生区王禅寺 2 6 2 5

【氏名】 柴田 健志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市中町 3 - 9 - 1 3

【氏名】 山▲崎▼ 基生

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市森野 4 - 1 7 - 1 7

【氏名】 吉田 哲郎

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市本町田 2 1 4 1 - 6 9

【氏名】 水上 民夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市中町 3 - 9 - 1 1

【氏名】 新海 暁男

【発明者】

【住所又は居所】 東京都練馬区南大泉 4 - 1 9 - 1 8

【氏名】 穴澤 秀治

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

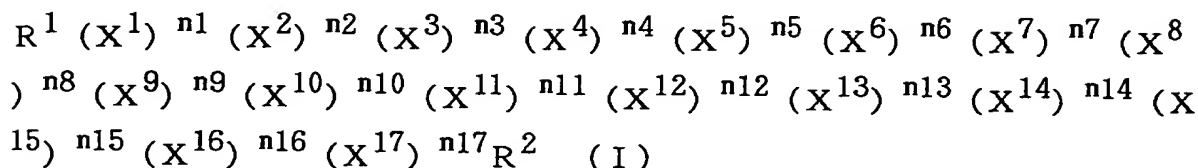
【書類名】 明細書

【発明の名称】 変異 P53 蛋白質の転写活性を復活させる環状構造を持つペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式 (I)



(式中、 $X^1 \sim X^{17}$  および  $n1 \sim n17$  の任意の位置をそれぞれ  $X^i$  および  $n_i$  (但し、 $i$  は  $1 \sim 17$  の整数から選ばれる) で表す。 $X^i$  は以下に示すアミノ酸または有機基の各残基を表す。 $n_i$  は  $0$  または  $1$  を表し、 $(X^i)^{n_i}$  は、 $n_i = 1$  である場合、 $X^i$  それ自身を表し、 $n_i = 0$  である場合、結合を表す。 $n_i = 1$  である  $7 \sim 17$  個の異なる  $X^i$  を選択し、選択された  $X^i$  を  $i$  の小さい順に並べて結合させ N 末端に  $R^1$  を、C 末端に  $R^2$  を結合させることによって一つの配列を表す。各配列中、 $X^1 \sim X^{11}$  から選ばれる残基  $X^p$  (但し、 $p$  は  $1 \sim 11$  から選ばれる) における 1 官能基と  $X^8 \sim X^{17}$  から選ばれる残基  $X^q$  (但し、 $q$  は  $8 \sim 17$  から選ばれ、 $p < q$  を満たす) における 1 官能基によって環状構造が形成されているものとする。 $R^1$  は置換もしくは非置換アルカノイル、置換もしくは非置換アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換アラルキルオキシカルボニル、置換もしくは非置換アリールオキシカルボニル、置換もしくは非置換アロイル、9-フルオレニルメトキシカルボニル、または水素を表し、 $X^1$  は 2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、スベリン酸、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、または 3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリンを表し、 $X^2$  はロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン

、ノルバリン、ノルロイシン、2-アミノブタン酸、ホモロイシン、 $\beta$ -アラニン、 $\alpha$ -アミノイソブタン酸、 $\beta$ -シクロプロピルアラニン、 $\beta$ -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、*t*-ブチルグリシン、ジエチルグリシン、*t*-ブチルアラニン、*O*-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^3$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^4$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^5$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^6$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^7$ はアラニン、 $\beta$ -アラニン、2-アミノ安息香酸、3-アミノ安息香酸、4-アミノ安息香酸、3-アミノメチル安息香酸、プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、*L*-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-7-カルボン酸、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、*p*-アミノフェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、またはグリシンを表し、 $X^8$ はグルタミン、アスパラギン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセ

リン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^9$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^{10}$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^{11}$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^{12}$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^{13}$ はヒスチジン、アラニン、4-チアゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、2-ピリジルアラニン、3-ピリジルアラニン、4-ピリジルアラニン、(3-N-メチル)ピペリジルアラニン、3-(2-キノイル)アラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン

、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^{14}$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、またはグリシンを表し、ここで $X^{14}$ の側鎖のアミノ基またはguanidino基は $R^3$  ( $R^3$ は $R^1$ と同義である)で修飾されてもよく、 $X^{15}$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^{16}$ はロイシン、アラニン、4-チアゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、イソロイシン、ノルロイシン、ホモロイシン、バリン、ノルバリン、 $\beta$ -アラニン、 $\alpha$ -アミノイソブタン酸、2-アミノブタン酸、 $\beta$ -シクロプロピルアラニン、 $\beta$ -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、t-ブチルグリシン、ジエチルグリシン、t-ブチルアラニン、O-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^{17}$ は2-メルカプトアニリン、システアミン、ホモシステアミン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、オルニチン、リジン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、p-アミノフェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、または2-アミノスベリン酸を表し、 $R^2$ は置換もしくは非置換アルコキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、またはヒドロキシ基を表す。さらに配列中の任意の位置において、同一または異なって1~4残基の上記 $X^i$ で表される有機基、アミノ酸、および12-アミノドデカン酸から選ばれる任意の残基が付加さ

れていてもよい。) で表され、変異 P53 蛋白質の転写活性を復活させる活性を持つ環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項2】

環状構造が $X^P$ および $X^Q$ の間で $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $O-CO$ 、または $CO-O$ 結合によって形成される請求項1記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項3】

$X^P$ がN末端残基であり $X^Q$ がC末端残基である請求項2記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項4】

$X^P$ がN末端以外の配列中の残基であり、 $X^Q$ がC末端以外の配列中の残基である請求項2記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項5】

$X^P$ がN末端以外の配列中の残基であり、 $X^Q$ がC末端残基である請求項2記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項6】

$X^P$ がN末端残基であり、 $X^Q$ がC末端以外の配列中の残基である請求項2記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項7】

$X^P$ が $X^1$ であり、 $X^Q$ が $X^{17}$ である請求項3記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項8】

$X^P$ がN末端残基であり、 $X^Q$ が $X^{14}$ である請求項6記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項9】

$X^P$ が $X^8$ であり、 $X^Q$ がC末端残基である請求項5記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項10】

$X^P$ が $X^8$ であり、 $X^Q$ が $X^{14}$ である請求項4記載の環状構造を持つペプチドま



たはその薬理的に許容される塩。

【請求項 1 1】

配列番号 16～21 で表され、配列中、請求項 1 における  $X^i$  で表される有機基、アミノ酸、および 12-アミノドデカン酸から選ばれる 1～4 残基のアミノ酸が欠失、置換、または付加されていてもよい請求項 1 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【請求項 1 2】

配列番号 4～7 で表され、配列中、請求項 1 における  $X^i$  で表される有機基、アミノ酸、および 12-アミノドデカン酸から選ばれる 1～4 残基のアミノ酸が欠失、置換、または付加されていてもよい請求項 1 記載の環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、変異 P53 蛋白質の特異的 DNA 結合活性を回復させる活性を有する環状構造を持つ新規ペプチドおよびその薬理的に許容される塩に関する。該ペプチドは、ヒト P53 蛋白質の C 末端近傍の配列、あるいはその一部に変異を導入した配列をその主要な構造とし、点変異によって特異的 DNA との結合能力を失った変異 P53 に結合してその特異的 DNA に対する結合活性を回復させる。さらに該ペプチドは P53 依存性の転写を回復させるため癌の治療薬として有用である。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子 p53 は、ヒト癌においてもっとも高頻度で変異が見いだされている癌抑制遺伝子である。その変異は乳癌、大腸癌、肺癌をはじめ、殆どの癌種で見いだされており、全ての癌患者の 50 % 以上で p53 遺伝子の変異が存在すると考えられている〔サイエンス (Science), 253 巻, 49 頁 (1991 年)〕。また、多くの種類の癌において、p53 の変異の有無と、悪性度、予後経過、転移の有無等に相関があることが知られており、p53 を欠失したマウスに癌が頻発すること

からも、p53 が発癌抑制に重要な機能を果たしていることは明らかである〔ネイチャー (Nature) , 356 巻, 215 頁 (1992 年) 〕。

【0003】

遺伝子 p53 の主要な生物学的役割は、細胞が DNA 損傷を受けた際に、1) 細胞を G1 期に停止させる、2) アポトーシス (細胞死) に向かわせる、等であり、癌細胞に見られる変異型 p53 ではこれらの能力が失われている。近年、正常 P53 蛋白質 (以後 P53 は遺伝子 p53 が発現した蛋白質の意味で用いる) は、特定の塩基配列に結合して転写を活性化する転写制御因子として機能することが明らかになってきた〔セル (Cell) , 78 巻, 543 頁 (1994 年) 〕。P53 によって転写活性化される遺伝子としては、CDK インヒビターの p21waf1、GADD45、bax 等が知られており、細胞を G1 停止やアポトーシスに導くのに重要な機能を果たすと考えられている〔セル (Cell) , 75 巻, 817 頁 (1993 年) 、同, 71 巻, 587~597 頁 (1992 年) 、同, 80 巻, 293 頁 (1995 年) 〕。

【0004】

こうした DNA 結合活性、転写活性化活性を失っている変異 p53/P53 を有する癌細胞に働きかけて、上記活性を回復させ結果として癌を抑制する方法としては、野生型 p53 遺伝子を細胞に戻す遺伝子治療の試みがある。実際に、ヒト肺癌、頭頸部癌等のマウス移植腫瘍に対して野生型 p53 遺伝子の導入が、単独投与あるいは既存抗癌剤との併用で、有効であると報告されている〔キャンサー・リサーチ (Cancer Research) , 54 巻, 2287 頁 (1994 年) 、同, 55 巻, 1 頁 (1995 年) 〕。また、ヒト非小細胞肺癌においても野生型 p53 遺伝子の直接導入が有効であると最近報告され、細胞内の p53/P53 の活性を回復させることが癌に対して臨床的に有効であることが明らかにされた〔ネイチャー・メディシン (Nature Med.) , 2 巻, 985 頁 (1996 年) 〕。しかし、遺伝子治療に付随する制約も大きく、p53/P53 に変異を有する細胞に p53/P53 の活性を回復させるためのより簡便ですぐれた方法が求められている。

【0005】

遺伝子 p53 における変異は他の癌抑制遺伝子に見られる変異とは異なり、その多くがミスセンス (点) 突然変異であり、欠失・挿入突然変異は少ない。1 ア

ミノ酸の置換により P53 の高次構造上の変化が起きるために、上記の特異的な DNA の塩基配列に結合する活性および転写を活性化する活性が共に失われており、その結果として DNA 損傷時の細胞の G1 期停止、アポトーシス誘導が起こらなくなっていると考えられている〔サイエンス (Science), 256 巻, 827 頁 (1992 年)〕。ヒト癌で見られる p53 のミスセンス突然変異の約 90 % は 11 のエクソンのうちのエクソン 5~8 (コドン 126~306) に局在しており、なかでもコドン 143、175、245、248、249、273、282 等はホットスポットとよばれ、発癌部位によってその頻度は少しずつ異なるものの多くの変異が集中している〔ビオケミカ・ビオフィジカ・アクタ (Biochemica Biophysica Acta) 1155 巻, 181 頁 (1993 年)、キャンサー・リサーチ (Cancer Research) 54 巻, 4855 頁 (1994 年)〕。P53 の DNA 結合領域の X 線結晶構造解析の結果から、これらホットスポットに見られるアミノ酸置換は、1) DNA 鎖の塩基あるいはバックボーンに直接作用する残基 (コドン 248、273 等) の変異、および 2) DNA 結合領域の構造の安定化に寄与する残基 (コドン 143、175、249、282 等) に生じるものであると考えられている〔サイエンス (Science), 265 巻, 346 頁 (1994 年)〕。これら DNA 結合領域に見られる点変異は、1)、2) いずれの場合も、P53 の塩基配列特異的 DNA 結合活性を失わせる。従って、これら点突然変異あるいはその他の変異によって特異的 DNA 結合活性を失っている P53 に相互作用して、その DNA 結合活性を回復させることが可能な物質は抗腫瘍活性を有することが期待される。

【0006】

変異 P53 の DNA 結合を回復させる物質としては、P53 の C 末端近傍の配列をエピトープとするモノクローナル抗体 Pab421、大腸菌の熱ショック蛋白質 DnaK が報告されている〔ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 21 巻, 3167 頁 (1993 年)〕。また、最近、変異 P53 の DNA に相互作用している残基にさらに変異を加える (284Thr を Arg に変異) ことで、一部の変異 p53 の DNA 結合活性が回復することが示された〔ネイチャー・メディシン (Nature Medicine), 2 巻, 1143 頁 (1996 年)〕。Pab421 の導入、および Arg284 の変異の導入により、一部の変異 p53 蛋白質に関しては転写活性化能も

回復しうることが報告されている〔キャンサー・リサーチ (Cancer Research) 5 巻, 3490 頁 (1995 年)、ネイチャー・メディシン (Nature Medicine) 2 巻, 1143 頁 (1996 年)〕。これらの結果は、変異 P53 に直接作用して DNA 結合を回復させることで、転写活性化活性も回復させ、抗腫瘍活性をもたせることが可能であることを示唆している。そうした活性を有する低分子化合物については、ゲルダナマイシン (Geldanamycin) が細胞内で変異 P53 を安定化するという報告があるが、その作用は間接的であり、おそらくは HSP90 蛋白質を介していると考えられている〔オンコジーン (Oncogene) 11 巻, 933 頁 (1995 年)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proceedings of the National Academy of Science USA) 93 巻, 8379 頁 (1996 年)〕。また、エリプチシンが P53 のりん酸化に寄与する酵素を阻害する活性をもち、これにより癌細胞で大量に発現している変異型 P53 のりん酸化を阻害することによって選択的に癌細胞のアポトーシスを誘起させるという報告がある (特開平 6-279441 号公報)。

【0007】

P53 の有する転写活性化の制御機構としては、C末端の 30 アミノ酸を欠失させることで野生型 P53 のDNA結合活性が高まることから、C末端の塩基性に富む配列がアロステリックに活性を負に制御していると考えられている〔ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 21 巻, 3167 頁 (1993 年)、ネイチャー・メディシン (Nature Medicine), 2 巻, 1143 頁 (1996 年)〕。また、このC末端の配列は変異 P53 の DNA 結合活性を回復させる上記のモノクローナル抗体 Pab421 のエピトープであることから、C末端の配列が分子内、あるいは分子間で P53 の DNA 結合領域と相互作用することで、その DNA 結合活性を抑制していることが推測される。実際、このエピトープ部分を含む P53 のC末端近傍由来のペプチドについては、12~15 アミノ酸残基よりなるペプチドが、大腸菌または酵母で発現させた野生型 P53 の DNA 結合能力を高めるという報告が最近なされている〔セル (Cell), 83巻, 237 頁 (1995年)、オンコジーン (Oncogene), 12巻, 921 頁 (1996年)〕。また最近、P53 のC末端近傍 13 アミノ酸残基よりなるペプチド (コドン 371-383) が、コドン 273 が His

に変異したヒト P53 (以下 P53His273 と記述) の *in vitro* の特異的 DNA 結合活性を一部回復させるという報告がなされた (特許国際公開 WO 96/25434 号) 。ペプチド濃度が 0.4 mM と極めて高濃度での結果であり、実際の細胞内の変異 P53 の活性を回復させるという結果は得られておらず、このペプチドの His273 以外の変異 P53 に対する効果も明らかではない。細胞内でこのペプチドが変異 P53 の転写活性、増殖抑制活性を回復させるかどうか不明である。さらに最近になって、P53 の C 末端近傍よりなるペプチド (コドン 369-382) の一個所のリジンを (Lys381 に相当する) ポリエチレングリコール (PEG) 化修飾したものを、ヒト大腸癌由来細胞株 SW480 (273Arg が His に、また 309Pro が Ser となった変異を有する) にマイクロインジェクションしたところ、該細胞由来の P53 の転写活性が回復したという報告がなされた [オンコジーン (Oncogene)、13 巻、2477 頁 (1997 年)] 。

【0008】

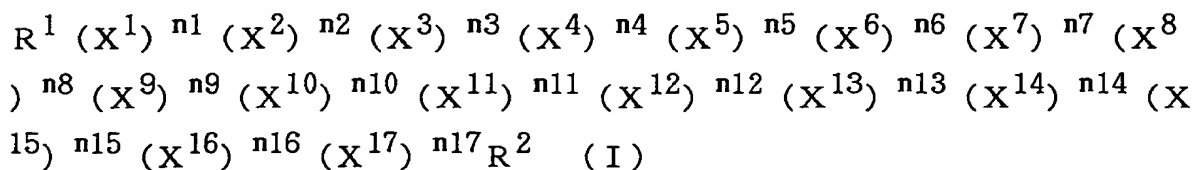
【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、変異 P53 の特異的 DNA 結合活性を回復させ、それにより P53 依存性の転写活性、増殖抑制活性を回復させることで、単独または既存の化学療法剤との併用で優れた抗腫瘍活性を示す環状構造を持つ新規ペプチドを提供することにある。また、既存の化学療法剤と該ペプチドを併用することにより得られる効果には従来の化学療法剤に対して抵抗性を示す悪性腫瘍に対する有効性も含まれる。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、一般式 (I)



{式中、 $X^1 \sim X^{17}$  および  $n1 \sim n17$  の任意の位置をそれぞれ  $X^i$  および  $n_i$  (但し、 $i$  は 1~17 の整数から選ばれる) で表す。 $X^i$  は以下に示すアミノ酸または有機基の各残基を表す。 $n_i$  は 0 または 1 を表し、 $(X^i)^{n_i}$  は、 $n_i = 1$

である場合、 $X^i$ それ自身を表し、 $n_i = 0$ である場合、結合を表す。 $n_i = 1$ である7～17個の異なる $X^i$ を選択し、選択された $X^i$ を $i$ の小さい順に並べて結合させN末端に $R^1$ を、C末端に $R^2$ を結合させることによって一つの配列を表す。各配列中、 $X^1 \sim X^{11}$ から選ばれる残基 $X^p$ （但し、 $p$ は1～11から選ばれる）における1官能基と $X^8 \sim X^{17}$ から選ばれる残基 $X^q$ （但し、 $q$ は8～17から選ばれ、 $p < q$ を満たす）における1官能基によって環状構造が形成されているものとする。 $R^1$ は置換もしくは非置換アルカノイル、置換もしくは非置換アルコキシカルボニル、置換もしくは非置換アラルキルオキシカルボニル、置換もしくは非置換アリールオキシカルボニル、置換もしくは非置換アロイル、9-フルオレニルメトキシカルボニル、または水素を表し、 $X^1$ は2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、スベリン酸、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、 $p$ -アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、または3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリンを表し、 $X^2$ はロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、ノルバリン、ノルロイシン、2-アミノブタン酸、ホモロイシン、 $\beta$ -アラニン、 $\alpha$ -アミノイソブタン酸、 $\beta$ -シクロプロピルアラニン、 $\beta$ -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、 $t$ -ブチルグリシン、ジエチルグリシン、 $t$ -ブチルアラニン、0-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^3$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、 $p$ -アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^4$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、

p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^5$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^6$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^7$ はアラニン、 $\beta$ -アラニン、2-アミノ安息香酸、3-アミノ安息香酸、4-アミノ安息香酸、3-アミノメチル安息香酸、プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、L-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-7-カルボン酸、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、オルニチン、リジン、p-アミノフェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、またはグリシンを表し、 $X^8$ はグルタミン、アスパラギン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^9$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^{10}$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソ

アスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、  
 オルニチン、リジン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-  
 アミノフェニルアラニン、グリシン、2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロ  
 ピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリ  
 ン酸を表し、 $X^{11}$ はセリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、ヒド  
 ロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン酸  
 、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、  
 2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジン、2,4-ジアミノ  
 ブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、グリシン、  
 2-メルカプト安息香酸、3-メルカプトプロピオン酸、4-メルカプトブタン酸、メ  
 ルカプト酢酸、アジピン酸、またはスベリン酸を表し、 $X^{12}$ はリジン、アルギニ  
 ン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノ  
 フェニルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^{13}$ はヒスチジン、アラニン、4-チ  
 アゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、2-ピリジルアラニン、3-ピリジルアラ  
 ニン、4-ピリジルアラニン、(3-N-メチル)ピペリジルアラニン、3-(2-キノイル)  
 アラニン、セリン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシ  
 プロリン、4-ヒドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン  
 、アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イ  
 ソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、オルニチン、リジ  
 ン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラ  
 ニン、またはグリシンを表し、 $X^{14}$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジ  
 アミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、セリ  
 ン、スレオニン、ホモセリン、 $\alpha$ -メチルセリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒ  
 ドロキシプロリン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、アスパラギン  
 酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸  
 、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸、またはグリシンを表し、ここで $X$   
 $^{14}$ の側鎖のアミノ基またはグアニジノ基は $R^3$  ( $R^3$ は $R^1$ と同義である)で修飾  
 されてもよく、 $X^{15}$ はリジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸  
 、2,3-ジアミノプロピオン酸、p-アミノフェニルアラニン、またはグリシンを表



し、 $X^{16}$ はロイシン、アラニン、4-チアゾリルアラニン、2-チエニルアラニン、イソロイシン、ノルロイシン、ホモロイシン、バリン、ノルバリン、 $\beta$ -アラニン、 $\alpha$ -アミノイソブタン酸、2-アミノブタン酸、 $\beta$ -シクロプロピルアラニン、 $\beta$ -クロロアラニン、1-アミノシクロペンタン-1-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサンカルボン酸、2-アミノ-1-シクロペンタンカルボン酸、*t*-ブチルグリシン、ジエチルグリシン、*t*-ブチルアラニン、*O*-メチルセリン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、またはグリシンを表し、 $X^{17}$ は 2-メルカプトアニリン、システアミン、ホモシステアミン、システイン、ホモシステイン、ペニシラミン、オルニチン、リジン、2,3-ジアミノプロピオン酸、2,4-ジアミノブタン酸、*p*-アミノフェニルアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、ホモグルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、または 2-アミノスベリン酸を表し、 $R^2$ は置換もしくは非置換アルコキシ、置換もしくは非置換アラルキルオキシ、アミノ、置換もしくは非置換アルキルアミノ、置換もしくは非置換ジアルキルアミノ、置換もしくは非置換アラルキルアミノ、置換もしくは非置換アリールアミノ、またはヒドロキシ基を表す。さらに配列中の任意の位置において、同一または異なって 1~4 残基の上記  $X^i$  で表される有機基、アミノ酸、および 12-アミノドデカン酸から選ばれる任意の残基が付加されていてもよい。} で表され、変異 P53 蛋白質の転写活性を復活させる活性を持つ環状構造を持つペプチドおよびその薬理的に許容される塩を提供する。

【0010】

以下、式 (I) で表される化合物を化合物 (I) と呼ぶ。

【0011】

【発明の実施の形態】

式 (I) の  $R^1$  および  $R^2$  の定義において、アルカノイル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノ、およびジアルキルアミノにおけるアルキル部分としては炭素数 1~20 の直鎖または分岐状のアルキル、あるいは炭素数 3~8 の脂環式アルキルがあげられる。炭素数 1~20 の直鎖または分岐状のアルキルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、ヘキ

シル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、ヘキサデシル、またはオクタデシルなどがあげられる。炭素数 3~8 の脂環式アルキルとしては、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、またはシクロオクチルなどがあげられる。アリアルオキシカルボニル、アロイル、またはアリアルアミノのアリアル部分としては、例えばフェニルまたはナフチルなどがあげられる。アラルキルオキシカルボニル、アラルキルオキシ、またはアラルキルアミノにおけるアラルキル部分としては炭素数 7~20 のベンジル、フェネチル、ベンズヒドリル、またはトリチルなどがあげられる。アルカノイル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリアルオキシカルボニル、アロイル、アリアルアミノ、アラルキルオキシカルボニル、アラルキルオキシ、およびアラルキルアミノにおける置換基としては、同一または異なって置換数 1~3 のハロゲン、ニトロ、アルキル、アリアル、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリアルオキシ、カルボキシ、アルコキシカルボニル、アリアルオキシカルボニル、または複素環基などがあげられる。該置換基においてハロゲンはフッ素、塩素、臭素、またはヨウ素を表し、アルキル、アルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、およびアルコキシカルボニルにおけるアルキル部分および、アリアル、アリアルオキシ、およびアリアルオキシカルボニルにおけるアリアル部分は前記と同義である。複素環基は、酸素、硫黄、窒素などのヘテロ原子を少なくとも 1 個以上含む 3~8 員環の脂肪族複素環基、芳香族複素環基、およびそれらの縮合多環基もしくはそれらとアリアルとの縮合多環基を含み、例えばイミダゾリル、ピリジル、インドリル、キノリル、イソキノリル、ピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノ、ホモピペラジニルなどがあげられる。配列中、付加されてもよい 1~4 残基の任意のアミノ酸、有機基の中には上記のアミノ酸の他、12-アミノドデカン酸が含まれる。

#### 【0012】

配列中、1~4 の任意の残基が欠失、置換、または付加されてよいとは、該配列中の任意に選ばれる単一もしくは複数個の位置における単一もしくは複数個の、上記のアミノ酸、有機基、および 12-アミノドデカン酸の中から選ばれる残基

の欠失、置換、または付加の総数が1～4残基であることを意味し、欠失、置換、または付加が同時に生じてよい。配列中、1～4の任意の残基が付加されてよいとは上記において付加のみが生じ得ることを意味する。

## 【0013】

化合物(I)の薬理学的に許容される塩としては、酸付加塩、金属塩、有機塩基付加塩等があげられる。薬理学的に許容される酸付加塩としては、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩等の有機酸塩があげられ、薬理学的に許容される金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等があげられる。薬理学的に許容される有機塩基付加塩としては、メチルアミン、エチルアミン、アニリン等の一級アミン、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、ピペラジン等の二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、N,N-ジメチルアニリン、ピリジン等の三級アミンとで形成される塩、アンモニウム塩等があげられる。

## 【0014】

本発明において使用したアミノ酸およびその保護基に関する略号は、生化学命名に関するIUPAC-IUB委員会(IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature)の勧告[ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(European Journal of Biochemistry), 138巻, 9頁(1984年)]に従った。

以下の略号は、特に断わらない限り対応する下記のアミノ酸を表す。

Gly: グリシン

Thr: L-スレオニン

Gln: L-グルタミン

Glx: L-グルタミン酸または L-グルタミン

Leu: L-ロイシン

Ser: L-セリン

Lys: L-リジン

Arg: L-アルギニン

Asp: L-アスパラギン酸

His: L-ヒスチジン

Cys: L-システイン

次に本発明において好ましい環状構造を持つペプチドの具体例をあげる。環状構造形成に関する2つの $X^p$ および $X^q$ がN末端およびC末端残基である一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチド、環状構造形成に関する2つの $X^p$ および $X^q$ がN末端およびC末端以外の配列中の残基である一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチド、環状構造形成に関する $X^p$ がN末端以外の配列中の残基であり、 $X^q$ がC末端残基である一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチド、環状構造形成に関する $X^p$ がN末端残基であり、 $X^q$ がC末端以外の配列中の残基である一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチド、 $p$ が1であって $n_1$ が1であり、 $q$ が17であって $n_{17}$ が1であり、 $X^1$ と $X^{17}$ の $C\alpha$ 置換基または側鎖置換基を介して形成される架橋結合が $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $CO-O$ 、または $O-CO$ を表す一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチド、 $X^p$ がN末端にあり $n_p$ が1であり(但し $p < 14$ )、 $q$ が14であって $n_{14}$ が1であり、 $X^p$ と $X^{14}$ の $C\alpha$ 置換基または側鎖置換基を介して形成される架橋結合が $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $CO-O$ 、または $O-CO$ を表す一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチド、 $p$ が8であって $n_8$ が1であり、 $X^q$ がN末端にあって $n_q$ が1であり、 $X^8$ と $X^q$ の $C\alpha$ 置換基または側鎖置換基を介して形成される架橋結合が $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $CO-O$ 、または $O-CO$ を表す一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチド、および $p$ が8であって $n_8$ が1であり、 $q$ が14であって $n_{14}$ が1であり、 $X^8$ と $X^{14}$ の $C\alpha$ 置換基または側鎖置換基を介して形成される架橋結合が $S-S$ 、 $S-CH_2-S$ 、 $CO-NH$ 、 $NH-CO$ 、 $CO-O$ 、または $O-CO$ を表す一般式(I)で表わされる環状構造を持つペプチドは本発明における環状構造を持つペプチドの中で好ましい例である。

【0015】

次に、好ましい化合物(I)をさらに具体的に第1表中に例示し、また化合物

(I) に近縁の直鎖ペプチドを参考例として同表中に示す。これらの中でとりわけ配列4～7が好ましい。

【0016】

【表1】

第1表

化合物番号	構造
1.	H-LKSKKGQSTSRHKKL-OH
2	H-KSKKGQSTSRHKK-OH
3	H-KKGQSTSRHKK-OH
4	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-OH
5	LKSKKGQSTSRHKKL
6	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH <sub>2</sub>
7	Ac-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH <sub>2</sub>
8	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CONH <sub>2</sub>
9	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -CH <sub>3</sub>
10	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>
11	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH <sub>2</sub>   Ac
12	H-CLKSKKGQSTSRHKKLC-NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> )
13	H-KLKSCKKGQSTSRHKKL
14	H-CLKSKKGCSTSRHKKL-NH <sub>2</sub>
15	H-KLKSCKGDSTSRHKKL-NH <sub>2</sub>
16	H-LKSKKGDSTSRHKKL-NH <sub>2</sub>

アミノ酸残基は一文字標記で示す。略号との対応は以下の通りである。  
G; Gly, T; Thr, D; Asp, Q; Gln, L; Leu, S; Ser, K; Lys, R; Arg, H; His, C; Cys

【0017】

化合物1は配列番号1、化合物2は配列番号2、化合物3は配列番号3、化合物4は配列番号4、化合物5は配列番号5、化合物6は配列番号6、化合物7は配列番号7、化合物8は配列番号16、化合物9は配列番号17、化合物10は配列番号18、化合物11は配列番号19、化合物12は配列番号20、化合物13は配列番号21、化合物14は配列番号22、化合物15は配列番号23、化合物16は配列番号24に対応する。

【0018】

以下の略号は、対応する下記のアミノ酸の保護基および側鎖保護アミノ酸を表す。

Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル

t-Bu: t-ブチル

Trt: トリチル

Pmc: 2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル

Boc: t-ブチルオキシカルボニル

Fmoc-Thr(t-Bu)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-スレオニン

Fmoc-Thr(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-トリチル-L-スレオニン

Fmoc-Ser(t-Bu)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-t-ブチル-L-セリン

Fmoc-Ser(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-O-トリチル-L-セリン

Fmoc-Lys(Boc)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N $\epsilon$ -t-ブチルオキシカルボニル-L-リジン

Fmoc-Gln(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N $\delta$ -トリチル-L-グルタミン

Fmoc-Arg(Pmc)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N $\epsilon^g$ -2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル-L-アルギニン

Fmoc-His(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-N<sup>im</sup>-トリチル-L-ヒスチジン

Fmoc-Cys(Trt)-OH: N $\alpha$ -9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-S-トリチル-L-システイン

以下の略号は、対応する下記の反応溶媒、反応試薬等を表す。

PyBOP: ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリピロリジノフォスフォニウム・ヘキサフルオロフォスフェート

HBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム・ヘキサフルオロホスフェート

HOBt: N-ヒドロキシベンゾトリアゾール

HONSu: N-ヒドロキシスクシンイミド

NMM: N-メチルモルホリン

DMF: N,N-ジメチルホルムアミド

DCM: ジクロロメタン

DMSO: ジメチルスルホキシド

NMP: N-メチルピロリドン

TFA: トリフルオロ酢酸

DIEA: ジイソプロピルエチルアミン

TFE: トリフルオロエタノール

次に、化合物(I)の製造法について説明する。

【0019】

化合物(I)は、一般的な液相、固相ペプチド合成法およびそれらを適宜組み合わせる方法、またはそれらに準じる方法によって合成することができる〔ザ・ペプタイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第1巻(The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス(Erhard Gross)およびヨハン・マインホフアー(Johannes Meinhofer)編、アカデミック・プレス(Academic Press)、1979年、第2巻1980年、第3巻1981年；ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985年；続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991年；インターナショナル



・ジャーナル・オブ・ペプチド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide Protein Research)、35 巻、161 頁 (1990年) 〕。

【0020】

また、自動ペプチド合成機を用いることもできる。ペプチド合成機によるペプチドの合成は、島津製作所製ペプチド合成機、アプライド・バイオシステム社製 (Applied Biosystems, Inc., USA、以後 ABI 社と略称する) ペプチド合成機、アドバンスド・ケムテック社製 (Advanced ChemTech Inc., USA、以後 ACT 社と略称する) ペプチド合成機等の市販のペプチド合成機上で、適当に側鎖を保護した  $N\alpha$ -Fmoc-アミノ酸あるいは  $N\alpha$ -Boc-アミノ酸等を用い、それぞれの合成プログラムに従って実施することができる。

【0021】

化合物 (I) の原料となる保護アミノ酸および担体樹脂は、ABI 社、島津製作所、国産化学 (株)、ノバ・バイオケム社 (Nova Biochem)、渡辺化学 (株)、ACT 社、またはペプチド研究所 (株) 等から入手することができる。また、化合物 (I) の原料となる保護アミノ酸、保護有機酸、保護有機アミンは報告されている合成法に従って、あるいはそれに準じて合成することができる [ザ・ペプチイズ、アナリシス、シンセシス、バイオロジー、第 1 巻 (The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, vol. 1)、エアハルト・グロス (Erhard Gross) およびヨハン・マインホフアー (Johannes Meinhofer) 編、アカデミック・プレス (Academic Press)、1979 年、第 2 巻 1980 年、第 3 巻 1981 年；ペプチド合成の基礎と実験、泉屋信夫ら、丸善、1985 年；続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、矢島治明監修、廣川書店、1991 年；インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプチド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide Protein Research)、35 巻、161 頁 (1990年) 〕。

【0022】

ペプチドが環状構造を持っていることは本発明における特徴の一つであるが、環状化反応は液相法、固相法、またはそれらの組み合わせにより必要なアミノ酸残基と有機基を全て組み込み終わってから行う場合とペプチド鎖伸長の途中に行う場合がある。後者においては環状構造の完成後にさらにアミノ酸残基または有

機基を伸長して化合物 (I) を完成する。また、一般式 (I) 中の  $X^P$  と  $X^Q$  の間の架橋結合を形成する反応によって環状構造が完成する場合だけでなく、 $X^P$  と  $X^Q$  間の結合が形成された後、環状構造の一部をなすアミノ酸残基または有機基とその隣に当たるアミノ酸残基または有機基の間で CONH 結合が形成されることによって環状構造が完成してもよい。以下、環状構造の形成工程についてさらに詳しく説明する。

【0023】

以下の説明において、有機化学反応工程における一般的精製方法とは、例えば、中和、濾過、抽出、洗浄、乾燥、濃縮、析出、再結晶、各種クロマトグラフィー等を意味する。

【0024】

(工程 1-1) S-S 結合による環状結合の形成法

適当な保護基により保護されたチオール基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の 2 個所に有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって得た後に、チオール保護基以外の保護基をまず除去し、続いて該チオール保護基を除去することによって得られる前駆体ペプチドを酸化反応に付し、有機化学反応工程における一般的精製方法を経て目的の S-S 結合を含む環状構造を持つペプチドを製造することができる。

【0025】

1-1-A

該前駆体ペプチドを反応に不活性な溶媒中空気酸化に付すか、酸化剤と反応させることにより S-S 結合を持つ環状構造を持つペプチドを製造することができる。反応は  $0.5 \sim 5000 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは  $50 \sim 500 \mu\text{mol/l}$  のペプチド濃度で行う。溶媒は pH 4~9、好ましくは pH 6~8 に調整した 50 mM~1 M のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸 (Tris-HCl) 等の緩衝液、5~50 % 酢酸-水溶液、水、また DMF、DMSO、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノール等の有機溶媒を単独もしくは混合して用いる。酸化剤としては該前駆体ペプチドに対する重量比 0.1~1 倍量のフェリシアン化カリウム、同重量比 0.5~5 倍量、好ましくは等重量のよう素、溶媒量として 10~50 % の DMS

0 等が用いられる。反応は通常 0~40 ℃で、1 時間~1 週間で終了する。本酸化反応に際しグルタチオンを加えると収率の向上が図られることがあり、該前駆体ペプチドに対し重量比 0.5~5 倍量の酸化型グルタチオンとその 1/2 量の還元型グルタチオンを共存させて反応させてもよい〔ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society) 103 巻、5867 頁 (1981 年) ; 続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、239 頁、矢島治明監修、廣川書店 (1991 年) 〕。酸化剤としてよう素を用いる場合は反応終了後、亜鉛粉末を溶液からよう素の色が消えるまで加え、そのままで、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーによって精製する。酸化剤としてフェリシアン化カリウムを用いる場合は酢酸を加えて溶液を微酸性とした後、そのままで、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーによって精製してもよく、また Dowex 1X2(AcO-) (ダウ・ケミカル社) 等の陰イオン交換樹脂を加えて過剰のフェリシアン化カリウム (フェリシアンイオン、フェロシアンイオン) を吸着除去した後にそのままで、あるいは減圧下に濃縮後、各種クロマトグラフィーによって精製してもよい。

## 【0026】

また、所望の一個所の SH 基をピリジルスルフェニル化または 2-ニトロピリジルスルフェニル化しておき、もう一方の SH 基を選択的に除去させると同時に一気に環化反応を進行させることもできる〔インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプチド・アンド・プロテイン・リサーチ (International Journal of Peptide and Protein Research) 29 巻、162 頁 (1987 年) 参照〕。環化反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記と同様である。さらに二個所の SH 基をフリー化した後、ピリジルスルフェニル化試薬または 2-ニトロピリジルスルフェニル化試薬を 1 当量分導入してもよい。ピリジルスルフェニル化反応には例えば 2,2'-ジチオジピリジンを用い、1~3 当量をペプチドを含む溶媒に加えて攪拌すればよい。2-ニトロピリジルスルフェニル化もこれに準じて行うことができる。反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記と同様である〔ペプチド・ケミストリー (Peptide Chemistry) 1991 巻、125 頁 (1992 年) 〕。

## 【0027】

## 1-1-B

適当な保護基により保護されたチオール基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の2個所に有するペプチドを、固相法によって伸長し、樹脂よりペプチドを切り出す前に、チオール保護基を選択的に除去し、酸化反応に付すことによって目的の環状構造を持つペプチド部分を製造することができる。その後樹脂よりペプチドを切り出しさらに残る保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが得られる。

## 【0028】

チオール保護基には例えばアセトアミドメチル (Acm) 基またはトリチル基 (Trt) を用いることができる。樹脂上の保護ペプチドを例えば DMF、DCM などの適当な溶媒中、よう素を反応させると Acm 基や Trt 基が除去されると同時に分子内ジスルフィド結合が形成される。樹脂 50 mg に対し、0.5~2 ml の溶媒を用い、樹脂上の該ペプチドの計算重量に対する重量比 0.5~5 倍量、好ましくは等重量のよう素と反応させる。反応は通常 0~40 °Cで行い、1 時間~1 週間で終了する。反応終了後は、固相法の通常処理、即ち、少量の DMF、DCM 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

## 【0029】

また、上記 1-A で述べた一個所の SH 基をピリジルスルフェニル化または 2-ニトロピリジルスルフェニル化する方法を固相法で行うこともでき、反応の条件は概ね環化反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記と同様である。さらに液相法と同様に二個所の SH 基をフリー化した後、ピリジルスルフェニル化試薬または 2-ニトロピリジルスルフェニル化試薬を 1 当量分導入してもよい。反応には例えば 2,2'-ジチオジピリジンを用い、1~3 当量を樹脂を膨潤させた溶媒に加えて攪拌すればよい。2-ニトロピリジルスルフェニル化も同様である。反応に用いられる溶媒、反応温度、および反応時間等は概ね上記固相反応における環化反応と同様である。

## 【0030】

(工程 1-2)  $S-CH_2-S$  結合による環状結合の形成法

S-ジメチルフォスフィノチオニル基を導入したチオール基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の2個所に有するペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造する。次いで塩化メチレンおよびテトラブチルアンモニウムフルオリド存在下に該ペプチドを反応させ、有機化学反応工程における一般的精製方法を経て目的の環状構造を持つペプチドを製造することができる〔ペプチド・ケミストリー (Peptide Chemistry) 1995、西則雄編、蛋白質研究奨励会 (Protein Research Foundation, Osaka)、41 頁 (1996 年)〕。

## 【0031】

## 1-2-A

溶媒は塩化メチレンそのものか塩化メチレンを含む反応に不活性な溶媒が単独もしくは組み合わせて用いられる。用いることができる溶媒としてはアセトニトリル、テトラヒドロフラン、クロロホルム、DMF 等があげられる。ペプチドの濃度は  $0.5 \sim 5000 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは  $50 \sim 500 \mu\text{mol/l}$  で反応を行なう。テトラブチルアンモニウムフルオリドは 2~10 当量、好ましくは 2~3 当量を用いる。反応は通常  $0 \sim 40^\circ\text{C}$  で、1 時間~1 週間で終了する。反応終了後、ジエチルエーテル等を加えてペプチドを沈殿させ、溶媒を除き、必要に応じ各種クロマトグラフィーで精製し、次の反応に用いることができる。必要に応じこうした操作を含む有機化学反応工程における一般的精製方法を用いることができる。

## 【0032】

## 1-2-B

S-ジメチルフォスフィノチオニル基を導入したチオール基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の2個所に有し、他の官能基が適当な保護基によって保護されたペプチドを、固相法によって伸長し、樹脂よりペプチドを切り出す前に塩化メチレンおよびテトラブチルアンモニウムフルオリド存在下に該ペプチドを反応させることによって目的の環状構造を持つペプチドを製造することができる。その後樹脂よりペプチドを切り出しさらに残る保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

## 【0033】

樹脂上の保護ペプチドを例えば DCM または DCM を含有する反応に不活性な D

MF 等の適当な溶媒中、テトラブチルアンモニウムフルオリドで処理することにより目的の環状構造が形成される。樹脂 50 mg に対し、0.5~2 ml の溶媒を用い、樹脂上の該ペプチドの計算モル数に対し 2~20 当量のテトラブチルアンモニウムフルオリドで処理する。反応は通常 0~40 ℃で行い、1 時間~1 週間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF、DCM 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

## 【0034】

(工程2) CO-NHまたはNH-CO結合による環状結合の形成法

適当な保護基により保護されたアミノ基を有するアミノ酸残基もしくは有機基および適当な保護基により保護されたカルボキシル基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の2個所に有する、側鎖、N末端、およびC末端の保護されたペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造する。その後、該アミノ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去することによって得られるペプチドを分子内縮合反応に付し、有機化学反応工程における一般的精製方法を経て、側鎖、N末端、およびC末端の保護された環状構造を持つペプチドを得、さらに残る保護基の脱保護反応を行うことにより目的のペプチドを製造することができる。また、環状構造を持つペプチド部分構造を得た後にペプチド鎖を伸長して目的のペプチドへと導いてもよい。本工程は、一般式(I)中の $X^P$ と $X^Q$ の間の架橋結合を形成する反応によって環状構造が完成する場合におけるCONH結合形成だけでなく、 $X^P$ と $X^Q$ 間の結合が形成された後、環状構造の一部をなすアミノ酸残基または有機基とその隣に当たるアミノ酸残基または有機基の間でCONH結合が形成されることによって環状構造が完成する場合にも用いることができる。

## 【0035】

## 2-A

アミノ基の保護基として 4-メチルトリチル基を用いる場合、該脱保護反応は酢酸／トリフルオロエタノール／DCM (1/2/7) を用いて行うことができる。反応は通常 0~40 ℃で行い、0.5~6 時間で終了する。反応終了後、ジエチルエーテル等を加えてペプチドを沈殿させ、溶媒を除くか、減圧下に溶媒を除く。必要

に応じこうした操作を含む有機化学反応工程における一般的精製方法を用いることができる。

## 【0036】

アミノ基の保護基としてアリルオキシカルボニル基を用い、カルボキシル基の保護基としてアリルエステル基を用いる場合、パラジウム触媒の存在下、還元剤を反応させれば一挙に所望の脱保護反応を進行させることができる。カルボキシル基のみの保護基にアリルエステル基を用いてもよい。パラジウム触媒は 0 価の均一系触媒であればいずれでもよく、テトラキス（トリフェニルフォスフィン）パラジウム（0）、または酢酸パラジウム（II）-トリフェニルフォスフィン等が例示される。添加量は上記保護基に対して 0.01~1 当量、好ましくは 0.1~0.5 当量を用いる。さらに添加剤として上記保護基に対して 1 当量から過剰量のギ酸、ギ酸-トリエチルアンモニウム、水素化トリブチルスズ、水素化トリフェニルスズ、トリメチルヒドロシラン、水素化ホウ素ナトリウム、酢酸、酢酸-NMM 等を加える。溶媒としては、エーテル、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、DMF、クロロホルム等を単独もしくは混合して用いることができる。アリルオキシカルボニル基またはアリルエステル基 1 mM に対し上記の試薬と溶媒 3~10 ml を加え、反応は -20~80 °C、好ましくは 0~30 °C で行い、10 分~6 時間で終了する。反応終了後、有機化学反応工程における一般的精製方法を用いることができる。

## 【0037】

得られたペプチドのフリーのアミノ基とカルボキシル基の間で分子間アミド結合を次に形成する。用いることができる環状アミド化反応には種々のものがあるが、代表的なものを以下にあげる。各反応に共通な条件として、反応溶媒は DMF、NMP、塩化メチレン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等を単独もしくは混合して用いる。ペプチドの濃度は 0.5~5000  $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは 50~500  $\mu\text{mol/l}$  で行う。反応は通常 0~40 °C、好ましくは 4~25 °C で攪拌し、通常 3 時間から 1 週間間で終了する。反応終了後、有機化学反応工程における一般的精製方法を用いることができる。

## 【0038】

カルボキシル基に対して 1~10 当量のジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) または水溶性カルボジイミド (WSC) 等のカルボジイミドを用いることができる。さらにカルボジイミドの 1.5~2 当量の NMM、DIEA、または炭酸水素ナトリウムを加える。必要に応じカルボジイミドに対し添加剤として等モル量の HOBt または HONSu を加えてもよい。

## 【0039】

カルボキシル基に対して 1~10 当量のジフェニルホスホリルアジド (DPPA) またはジエチルホスホロシアニデート (DEPC) を用いることもできる。さらにカルボジイミドの 1.5~2 当量の NMM、DIEA、または炭酸水素ナトリウムを加える。

カルボキシル基に対して 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量の PyBOP と等モルの HOBt または HBTU と等モルの HOBt を用いることもできる。さらに PyBOP または HBTU の 1.5~2 当量の NMM、DIEA、または炭酸水素ナトリウムを加える。

## 【0040】

また、一旦カルボキシル基を活性化エステルへと導いた後、所望のアミノ基の保護基を選択的に脱離し、続いてアミド結合を形成してもよい。活性化エステルとしては p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、N-オキシコハク酸イミドエステル等があげられる。活性化エステルの導入の方法は種々あるが、例えば DCC をカルボキシル基に対して 1~10 当量用い、等モルの p-ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノール、または HONSu を加えて 0~5℃で 1 時間~1 日攪拌後、生成するジシクロヘキシルウレア (DCUrea) を濾去後、有機化学反応工程における一般的精製方法を用いて精製することができる。本活性エステル形成反応に用いられる溶媒、反応温度、反応時間等は上記のアミド形成反応と同様である。

## 【0041】

## 2-B

適当な保護基により保護されたアミノ基を有するアミノ酸残基もしくは有機基および適当な保護基により保護されたカルボキシル基を有するアミノ酸残基もし



くは有機基を配列中の2個所に有するペプチドを固相法によって得、樹脂よりペプチドを切り出す前に、該アミノ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去することによって得られるフリーのアミノ基およびカルボキシル基を縮合反応に付し目的の環状構造を持つペプチド部分を形成することができる。その後、樹脂よりペプチドを切り出すと同時に他のアミノ酸残基の側鎖保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

## 【0042】

アミノ基の保護基として4-メチルトリチル基を用いる場合、該脱保護反応には樹脂 50 mg に対し、酢酸／トリフルオロエタノール／DCM (1/2/7) を 0.5～2 ml の割合で用いることができる。反応は通常 0～40 ℃で行い、0.5～6 時間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

## 【0043】

アミノ基の保護基としてアリルオキシカルボニル基を用い、カルボキシル基の保護基としてアリルエステル基を用いる場合、脱保護反応には通常 0.1～0.2 M のテトラキス（トリフェニルフォスフィン）パラジウム(0)、5 % 酢酸、2.5 % NMMを含むクロロホルム等の溶液を用いることができる。アリルオキシカルボニル基およびアリルエステル基 1 mM に対し上記クロロホルム溶液を 3～10 ml 加え、反応は通常 0～40 ℃で行い 0.5～6 時間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

## 【0044】

次に樹脂上の計算上のカルボキシル基量に対して 1～10 当量、好ましくは 2～5 当量の PyBOP または HBTU、PyBOP または HBTU と等モルの HOBt、および PyBOP または HBTU の 1.5～2 当量の NMM または DIEA を含む DMF、DCM、または NMP などの有機溶媒の溶液を樹脂 50 mg に対し 1ml の割合で用いる。反応は通常 0～40 ℃、好ましくは 4～25 ℃で攪拌し、通常 3 時間から 1 週間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

## 【0045】

(工程3) CO-OまたはO-CO結合による環状結合の形成法

適当な保護基により保護されたヒドロキシ基を有するアミノ酸残基もしくは有機基および適当な保護基により保護されたカルボキシル基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の2個所に有する、側鎖、N末端、およびC末端の保護されたペプチドを、固相法、液相法、またはそれらの組み合わせによって製造することができる。その後、該ヒドロキシ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去することによって得られるペプチドを縮合反応に付し、有機化学反応工程における一般的精製方法を経て、側鎖、N末端、およびC末端の保護された環状構造を持つペプチドを得、さらに残る保護基の脱保護反応を行うことにより目的のペプチドを製造することができる。また、環状構造を持つペプチド部分構造を得た後にペプチド鎖を伸長して目的のペプチドへと導いてもよい。

## 【0046】

## 3-A

ヒドロキシ基の保護基としてトリチル基を用いる場合、脱保護反応には TFA/TFE/DCM (5/5/90~1/5/94) を用いることができる。反応は通常 0~40 °Cで行い、0.5~12 時間で終了する。反応後、有機化学反応工程における一般的精製方法を用いることができる。またヒドロキシ基の選択的保護基として p-メトキシベンジル基または 2,4-ジメトキシベンジル基を用いることもでき、脱保護反応には保護されたヒドロキシ基の 1~10 当量の 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノンまたはセリック・アンモニウム・ナイトレートを用いる。反応溶媒は DMF、NMP、塩化メチレン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等を含水で単独もしくは混合して用いる。反応は通常 0~40 °Cで行い、0.5~12 時間で終了する。反応後、有機化学反応工程における一般的精製方法を用いることができる。

## 【0047】

所望のカルボキシル基の選択的保護、脱保護は工程2における2-Aに準じて行うことができる。

得られたペプチドのフリーのヒドロキシ基とカルボキシル基の間で分子内エス

テル結合を次に形成する。用いることができる環状エステル化反応には種々のものがあるが、代表的なものを以下にあげる。各反応に共通な条件として、反応溶媒は DMF、NMP、塩化メチレン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等を単独もしくは混合して用いる。ペプチドの濃度は  $0.5 \sim 5000 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは  $50 \sim 500 \mu\text{mol/l}$  で行う。反応は通常  $-20 \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $-20 \sim 30^\circ\text{C}$  で攪拌し、通常 3 時間から 1 週間で終了する。反応終了後、有機化学反応工程における一般的精製方法を用いることができる。

## 【0048】

側鎖にヒドロキシ基を有するペプチドの溶液に対し、1~10 当量の DCC を加え、 $-20 \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは  $-20 \sim 20^\circ\text{C}$  で攪拌する。ピリジンを溶媒として、または溶媒中に 10~100 % 共存させると好ましい。

カルボキシル基に対し 1~5 当量の 1-(2-メシチレンスルホニル)-3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール (MSNT) を加え、0.5~1.5 当量の N-メチルイミダゾールを加えて攪拌する〔テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Letters), 1701 頁 (1990 年)]。

## 【0049】

カルボキシル基に対して 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量の DEPC を加えてもよい〔テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Letters), 1595 頁 (1973 年)]。

## 【0050】

## 3-B

適当な保護基により保護されたヒドロキシ基を有するアミノ酸残基もしくは有機基および適当な保護基により保護されたカルボキシル基を有するアミノ酸残基もしくは有機基を配列中の 2 個所に有するペプチドを固相法によって得、樹脂よりペプチドを切り出す前に、該ヒドロキシ基および該カルボキシル基の保護基を選択的に除去することによって得られるフリーのヒドロキシ基およびカルボキシル基を縮合反応に付し目的の環状エステル部分を形成することができる。その後、樹脂よりペプチドを切り出すと同時に他のアミノ酸残基の側鎖保護基を除去すれば、目的の環状構造を持つペプチドが製造される。

## 【0051】

ヒドロキシ基の保護基としてトリチル基を用いる場合、該脱保護反応には樹脂 50 mg に対し、TFA/TFE/DCM (5/5/90~1/5/94) を 0.5~2 ml の割合で用いることができる。反応は通常 0~40 °Cで行い、0.5~12 時間で終了する。ヒドロキシ基の保護基として p-メトキシベンジル基または 2,4-ジメトキシベンジル基を用いることもでき、脱保護反応には樹脂上の保護されたヒドロキシ基の 1~10 当量の 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノンまたはセリック・アンモニウム・ナイトレートを用いる。DMF、DCM、または NMP などの有機溶媒の溶液を含水にて樹脂 50 mg に対し 0.5~1 ml の割合で用いる。反応は通常 0~40 °C、好ましくは 0~25 °Cで行い、通常 0.5~12 時間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

## 【0052】

所望のカルボキシル基の選択的保護、脱保護は工程 2 における 2-B に準じて行うことができる。

次に樹脂上の計算上のカルボキシル基量に対して 1~10 当量、好ましくは 2~5 当量の MSNT、または DEPC を含む DMF もしくは NMP を樹脂 50 mg に対し 0.5~2 ml の割合で用いる。反応は通常 -20~40 °C、好ましくは -20~20 °Cで攪拌し、通常 3 時間から 1 週間で終了する。反応終了後は、固相法の通常の処理、即ち、少量の DMF 等の溶媒で樹脂を洗浄し、次の反応に用いることができる。

## 【0053】

このようにして得られた化合物 (I) は最終的に C-4、C-8、または C-18 等の各種逆相シリカゲルカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLC と略称する)、または分配、吸着樹脂、シリカゲル、化学修飾シリカゲル、逆相シリカゲル、アルミナ、珪藻土、珪酸マグネシウム、イオン交換樹脂等を用いた各種カラムクロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィー、さらには各種セファロース、セファデックスを用いたゲル濾過等により精製することができる。

## 【0054】

化合物（I）の薬理上許容される塩を取得するときは常法に従う。すなわち、化合物（I）の酸付加塩および有機塩基付加塩は、対応する酸あるいは有機塩基の水溶液に化合物（I）をいったん溶解した上で凍結乾燥するか上記の適当な分離精製手段で精製することによって製造される。また、化合物（I）の金属塩は、対応する金属イオンを含む水溶液に化合物（I）を溶解し、同様に上記の適当な方法で精製することによって得られる。

【0055】

次に化合物（I）の代表的な例における薬理活性について試験例を示す。

【0056】

**試験例1 精製 P53 蛋白質を用いた変異 P53 の DNA 結合回復活性の測定  
野生型および変異型 P53 発現組み換えバキュロウイルスの作製**

変異 P53 の DNA 結合活性を測定するために、以下の方法で野生型および2種の変異型ヒト P53 蛋白質をバキュロウイルスを用いて昆虫細胞内に発現させた。昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスの作製が必要である。その作製はトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込む過程と、野生型ウイルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし相同組み換えにより組み換えウイルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーマンジェン（Pharmlngen）社製バキュロゴールドスターターキット（製品番号 PM-21001K）を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

【0057】

ヒト野生型および2種の変異型（Arg273→His および Arg248→Trp）p53 cDNA をそれぞれ含むプラスミド WT393、273His、248Trp [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proceedings of the National Academy of Science USA）, 89 巻, 5403 頁（1992 年）] より p53翻訳領域全長を含む NcoI-XbaI 断片（1.6 kb）を調製し、末端に XbaI、NcoI を有する以下の DNA 配列（配列17、18）を介して、バキュロウイルス発現ベクター pVL1393（ファーマンジェン社製）の XbaI 部位に挿入することで、トランスファーベクター pBP53WT、pBP53M7、pBP53M6 をそれぞれ造成した。ここで用い

た Arg273→His および Arg248→Trp の変異は共にヒト癌で多く見られる P53 の変異である。以下、それぞれ P53His273、P53Trp248 と略称する。

(配列 8、9)

5'-CTAGACAGCCAGACTGCCTTCCGGGTCCTGC-3'

3'-TGTCGGTCTGACGGAAGGCCAGTGACGGTAC-5'

続く組み換えウィルスの作製は TMN-FH インセクトメディウム (ファーマンジェン社製、以後 TMN-FH 培地と略称する) にて培養した昆虫細胞 Sf9 (ファーマンジェン社より購入、以後 Sf9 細胞と略称する) に線状バキュロウイルス DNA [バキュロゴールド・バキュロウイルス DNA (BaculoGold baculovirus DNA)、ファーマンジェン社製] および作製したトランスファーベクター DNA をリポフェクチン法にて導入すること [蛋白質核酸酵素、37 巻、2701 頁 (1992 年)] により行い組み換えバキュロウイルスを以下のように作製した。

【0058】

トランスファーベクター pBP53WT、pBP53M7 または pBP53M6 をそれぞれ 1  $\mu$ g と線状バキュロウイルス DNA の 20 ng とを 12  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン 6  $\mu$ l と蒸留水 6  $\mu$ l とを混和したものを加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞  $2 \times 10^6$  個を 2 ml の Sf900-II インセクトメディウム [ギブコ (Gibco) 社製、以後 Sf900-II 培地 と略称する] に懸濁し、直径 35 mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA、線状バキュロウイルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え 27  $^{\circ}$ C で 3 日間培養後、組み換えウィルスを含む培養上清 1 ml を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地 1 ml を加え、さらに 27  $^{\circ}$ C で 3 日間培養し組み換えウィルスを含む培養上清をさらに 1.5 ml 得た。

【0059】

次に蛋白発現に用いるために得られた組み換えウィルス以下の手順で増殖させた。

Sf9 細胞  $2 \times 10^7$  個を 10 ml の Sf900-II 培地に懸濁し、175  $\text{cm}^2$  フラスコ (グライナー社製) に入れて室温で 1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに 15 ml の TMN-FH 培地と上記の組み換えウィルス

を含む培養上清のうち 1 ml を加え 27 °C で 3 日間培養した。培養後上清を 1, 500×g で 10 分間遠心分離して細胞を除き、蛋白発現に使用する組み換えウィルス溶液を得た。

【0060】

得られた組み換えウィルス溶液についてウィルスの力価を以下の方法で算定した（ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキットマニュアル）。Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を 4 ml の Sf900-II 培地に懸濁し、直径 60 mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たに Sf900-II 培地 400  $\mu$ l と Sf900-II 培地で 10,000 倍に希釈した上記組み換えウィルス溶液を加え室温で 1 時間放置した後、培地を除き 5 ml の 1 % 低融点アガロース〔アガープレート・アガロース (Agarplate Agarose)、ファーマンジェン社製〕を含む培地（滅菌した 1 ml の 5 % アガープレート・アガロース水溶液と 4 ml の TMN-FH 培地を混和し、42 °C に保温したもの）を該シャーレに流し込んだ。室温で 15 分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27 °C で 6 日間培養した。該シャーレに 0.01 % ニュートラルレッドを含むりん酸バッファー化生理食塩水（phosphate buffered saline: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、以後 PBS 緩衝液と略称する）1 ml を加えさらに 1 日培養した後、出現したプラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約  $1 \times 10^8$  プラークフォーミングユニット（以後、pfu/ml と表す）のウィルスを含んでいることがわかった。

【0061】

昆虫細胞による野生型および変異型 P53 の発現

ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキットに添付されているマニュアルに従い以下の手順により野生型 P53 および変異型 P53His273、P53Trp248 蛋白質の発現を行った。野生型 P53、変異型 P53His273、および P53Trp248 蛋白質の培養液からの回収はヘパリンーセファロース（いずれもファルマシア・バイオテック社製）を用いて、ダニエルズ (D. A. Daniels) らの方法〔ジャーナ

ル・オブ・モレキュラーバイオロジー (Journal of Molecular Biology) , 243 巻, 639 頁 (1994 年) ] を改変した方法で行った。

【0062】

野生型および変異型 P53 蛋白質は以下のようにして得た。あらかじめ 27 °C で培養しておいた Sf9 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175 cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) 中で Sf900-II 培地 30 ml に懸濁し、27 °C で 30 分間放置した。培養上清を除き、新たに 10 ml の Sf900-II 培地と上で得られたトランスファーベクター pB P53WT、pBP53M7、または pBP53M6 由来の組み換えウィルスを約  $1 \times 10^8$  pfu/ml の濃度で含む溶液を 2 ml 加えた。室温で 1~2 時間ゆっくり振盪し、新たに 20 ml の TMN-FH 培地を加え、さらに 27 °C で 3~4 日間培養した。培養終了後、強く振盪することにより細胞を回収し、 $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い沈殿を得た。この沈殿を 5 ml の PBS 緩衝液で 2 回洗浄し、沈殿として内部に野生型あるいは変異型 P53 蛋白質を発現している細胞を回収した。

【0063】

上で取得した野生型あるいは変異型 P53 発現細胞  $3.6 \times 10^8$  個を 10 ml の緩衝液 [10 mM トリスー塩酸 (pH 7.5)、10 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ジチオスレイトール (以後 DTT と略称する)、0.5 mg/ml エチレンジアミン四酢酸 (以後 EDTA と略称する)、1 mg/ml ベンザミジン (benzamidine)、10 µg/ml ロイペプチン、10 µg/ml アンチパイン、以後、本緩衝液を G 緩衝液という] に懸濁し、50 ml 遠心管 (ファルコン社製 2070) 中で 0.5 M ショ糖を含む 10 ml の G 緩衝液の上に重層した。 $1,500 \times g$ 、10 分、4 °C で遠心し、沈殿を再び 5 ml の G 緩衝液に懸濁した。懸濁液をテフロンホモジナイザー (岩城硝子社製) に移し、ペッセルを 30 回上下することにより細胞を破碎した。破碎液 5 ml を再び 50 ml 遠心管内で 0.5 M ショ糖を含む 5 ml の G 緩衝液の上に重層し、 $1,500 \times g$ 、10 分、4 °C で遠心して、沈殿を核画分として回収した。この核画分を 5 ml の溶解緩衝液 [150 mM NaCl、50 mM トリスー塩酸 (pH 8.0)、5 mM EDTA、1 % ノニデット P-40 (以後、NP-40 と略称する)、1 mM ベンザミジン、以後、本緩衝液を溶解緩衝液 1 という] に懸濁し、0 °C、40 分放置後、 $12,000 \times g$ 、30 分、4 °C で遠心し、上清を取得した。上清を緩衝液 [20 mM 4-(2-ヒドロキシエ



チル) -1-ピペラジンエタンスルホン酸 (以後 HEPES と略称する) -KOH (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 0.1 % トリトン(Triton) X 100、5 mM DTT、1 mM ベンザミジン、15 % グリセロール、以後、本緩衝液を A 緩衝液という] で 4 倍容に希釈し、あらかじめ、A 緩衝液で平衡化した Hi-Trap<sup>TM</sup> ヘパリンセファローズ (Heparin-Sepharose) カラム (5 ml、ファルマシアバイオテク社製) に通塔した。カラムを 0.1 M KCl を含む A 緩衝液、50 ml で洗浄後、0.1~0.6 M KCl の直線的な濃度勾配を付けた A 緩衝液、40 ml を通塔し、ヘパリンに結合した蛋白質を溶出し、溶出液を 2 ml ずつ分画した。溶出した各画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分析することにより、野生型 P53、変異型 P53His273、および P53Trp248 蛋白質を高濃度に含む画分、各 8 ml を回収した。デンストメーターにより定量した P53 蛋白質の濃度は、野生型: 212  $\mu$ g/ml、変異型 P53His273: 230  $\mu$ g/ml、P53Trp248: 20  $\mu$ g/ml であった。

【0064】

#### 野生型および変異型 P53 蛋白質を用いたゲルシフト実験

5'-末端に蛍光標識を有し、中央部に P53 結合配列 [ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genetics), 1 巻, 45 頁 (1992 年)] を含む相補配列よりなる以下の 2 本のオリゴヌクレオチド (配列 10、11) を、FluorePrime<sup>TM</sup> (ファルマシアバイオテク社) を用いて合成した (DNA 合成機は ABI 社、Model 392 を使用)。

(配列 10、11)

5'-TCGAGAGACATGCCTAGACATGCCTG-3'

5'-TCGACAGGCATGTCTAGGCATGTCTC-3'

上記 2 本のオリゴヌクレオチド各 200 pmol を 0.2 ml の緩衝液 [10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、1 mM EDTA、以後、本緩衝液を TE 緩衝液という] に溶解し、70 °C、10 分保温した後、ゆっくりと室温まで冷却することによりアニリングを行ない、蛍光標識 P53 プローブとした。

【0065】

以下の物質を 20  $\mu$ l の反応液に加え、4 °C で 30 分間反応させた。

1) 0.2 pmol 蛍光標識 P53 プローブ

2) 100 ng Sf9 発現野生型 P53 蛋白質または変異型 P53 蛋白質 (P53His273、P53Trp248)

3) 2  $\mu$ g 仔牛胸腺 DNA

4) 20 mM HEPES pH 7.4, 40 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 % NP-40, 1 mM DTT

5) 0-100  $\mu$ M 試験化合物

反応後の試料を、0.5xTBE [2.5 mM Tris-Borate (pH 8.3), 0.1 mM EDTA] を泳動緩衝液として、4 % ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。野生型 P53 蛋白質は蛍光標識 P53 プローブに結合することで、移動度を減少させ、上方のバンドとして検出される。一方、2 種の変異型 P53 蛋白質は共にプローブに結合する活性を有さないが、試験化合物が存在すると、DNA 結合能を回復させ、移動バンドが検出されるようになる。泳動後、FluorImager<sup>TM</sup>SI 蛍光イメージアナライザー [モレキュラーダイナミクス (Molecular Dynamics) 社] を用いて蛍光バンドの検出を行った。P53His273 変異体についての結果を図 1 に、P53Trp248 変異体についての結果を図 2 にそれぞれ示す。

【0066】

また、各レーンについて移動したバンド中の蛍光物質の量を FluorImager<sup>TM</sup>SI 蛍光イメージアナライザーで測定し、試験化合物を反応系に含まない試料を基準に、以下の式にしたがって活性化率を計算した。変異 P53 を用いた場合は、試験化合物非存在下ではシフトしたバンドが明確に確認できない場合もあるが、試験化合物存在下のレーンのバンドに相当する位置、大きさの範囲に含まれる蛍光物質の量を定量した。定量結果を第 2 表に示す。

【0067】

【表 2】

第 2 表  
活性化率

化合物名	活性化率	
	P53His273	P53Trp248
化合物 1	8.0	2.2
化合物 2	10.3	1.2
化合物 3	3.3	1.8
化合物 4	37.2	6.0
化合物 5	15.0	3.5
化合物 6	22.5	11.2
化合物 7	12.4	4.4

化合物濃度：100  $\mu$  M

【0068】

活性化率 = B / A

A：試験化合物非存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

B：試験化合物存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

【0069】

試験例 2 培養細胞抽出液を用いた変異 P53 の DNA 結合回復活性の測定

ヒト類表皮癌細胞 A431 (American Type Culture Collection, ATCC CRL-1555) 内の p53 遺伝子はコドン 273 に Arg→His の変異を有することが明らかにされている [キヤンサー・リサーチ (Cancer Research), 54 巻, 2834 頁 (1994 年)]。この細胞から核抽出液を調製し、それを用いてゲルシフト実験を行なうことにより、試験化合物が組み換え変異 P53 蛋白質のみならず、細胞内で発現している変異 P53 蛋白質の DNA 結合活性も回復させることを以下の通り明らかにした。

【0070】

A431 細胞からの核抽出液の調製

ヒト A431 細胞を  $1\sim 2\times 10^5$  細胞/ml になるように、10 % 牛胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle medium、以後、DMEM-FBS 培地と略称する) 「ニッスイ」 (日水製薬製) 10 ml に懸濁し、直径 10 cm の細胞培養用ディッシュ (岩城硝子) に 10 ml 分注した。37 °C、5 %  $\text{CO}_2$  存在下で 2 日間培養した後、培地を吸引除去し、5 ml の PBS 緩衝液で洗浄した。2 ml の PBS 緩衝液を加えスクレイパーを用いて細胞を剥離し、1.5 ml 微量遠心チューブに移し、 $1,000\times g$ 、10 分間、4 °C で遠心して沈殿を回収した。沈殿を 0.4 ml の緩衝液 [20 mM HEPES (pH 7.9)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、10 % グリセロール、0.1 % NP-40、1 mM DTT、1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (以後、PMSF と略称する)、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 mg/ml ロイペプチン] に懸濁し、10 分間、0 °C で放置した後、 $1,000\times g$ 、10 分間、4 °C で遠心し、核画分として沈殿を回収した。沈殿を 0.4 ml の溶解緩衝液 [20 mM HEPES (pH 7.9)、50 mM NaCl、10 mM EDTA、2 mM エチレンビス (オキシエチレンニトリロ) 四酢酸 (以後、EGTA と略称する)、0.1 % NP-40、1 mM PMSF、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1 mg/ml ロイペプチン、以後、本緩衝液を溶解緩衝液 2 という] に懸濁し、10~20 分間、4 °C で激しく振盪した。 $10,000\times g$ 、10 分間、4 °C で遠心し、上清を回収し粗核抽出液とした。抽出液中の蛋白質濃度はプロテインアッセイキット (バイオラッド社製) を用いて測定した。3.5 mg/ml の蛋白質溶液が 0.4 ml 取得された。

【0071】

#### A431 細胞抽出液を用いたゲルシフト実験

取得した A431 細胞核抽出液を用い、前項と同じ蛍光 P53 結合配列 DNA プローブを用いてゲルシフト実験を行なった。以下の物質を 20  $\mu\text{l}$  の反応液に加え、4 °C で 30 分間反応させた。

- 1) 0.2 pmol 蛍光標識 P53 プローブ
- 2) 35  $\mu\text{g}$  A431 細胞核抽出液 (蛋白質質量換算)
- 3) 2  $\mu\text{g}$  poly(dI-dC) · poly(dI-dC) (ファルマシア・バイオテック)
- 3) 20 mM HEPES pH 7.4, 40 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM EDTA, 0.1 % NP-40, 1 mM DTT

4) 0-100  $\mu$ M 試験化合物

反応後の試料を、0.5xTBE [2.5 mM Tris-Borate (pH 8.3), 0.1 mM EDTA] を泳動緩衝液として、4 % ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動した。A431 細胞中の P53 蛋白質は変異型 (273Arg→His) であるのでプローブに結合する活性を有さないが、試験化合物が存在すると、DNA 結合能を回復させ、移動バンドが検出されるようになる。泳動後、FluorImager<sup>TM</sup>SI 蛍光イメージアナライザー (モレキュラーダイナミクス社) を用いて、蛍光バンドの検出を行った。結果を図3に示す。各レーンについて移動したバンド中の蛍光物質の量を FluorImager<sup>TM</sup>SI 蛍光イメージアナライザーで測定し、試験化合物を反応系に含まない試料を基準に、以下の式にしたがって活性化率を計算した。試験化合物非存在下ではシフトしたバンドが確認できない場合もあるが、試験化合物存在下のレーンのバンドに相当する位置、大きさの範囲に含まれる蛍光物質の量を定量した。定量結果を第3表に示す。

【0072】

【表3】

第3表

化合物名	活性化率
化合物 1	3.3
化合物 2	4.6
化合物 3	3.7
化合物 4	5.2
化合物 5	5.3
化合物 6	3.3
化合物 7	3.4

化合物濃度 : 100  $\mu$ M

【0073】

活性化率 = B / A

A：試験化合物非存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

B：試験化合物存在下におけるシフトしたバンド中の蛍光物質の量

【0074】

### 試験例3 P53 依存性転写活性化活性の測定

遺伝子 p53 に変異を有している細胞に試験化合物を導入することにより、変異 P53 が転写活性を回復し、P53 依存性の転写が増強することを、ルシフェラーゼレポーターを用いた実験により以下の方法で確認した。

#### P53応答レポータープラスミドの造成

以下の方法に従って P53 応答配列を転写制御領域に 8 コピー有し、その下流にホタルルシフェラーゼ (luciferase) 遺伝子をレポーター遺伝子として有するプラスミド p53RE8luc2 を造成した。造成の概略は図4に示した。

【0075】

ネオマイシン (neomycin) 耐性遺伝子を有するルシフェラーゼレポーターベクター-pluc2 [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (European Journal of Haematology), 52 巻, 73 頁 (1994 年)] の制限酵素 XhoI、HindIII 部位に、SV40 初期遺伝子のコアプロモーター領域の 200 塩基対からなる SphI-HindIII 断片 [128-0/5243-5171、塩基の番号はツーズ編 (Tooze, J.) モレキュラー・バイオロジー・オブ・テューモア・ウィルス (Molecular Biology of Tumor Viruses, 2nd Ed., Part 2 Revised. DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1982) による]、および下記の 2 本の合成オリゴヌクレオチド (配列 12、13) をアニーリングさせて得られる両端に XhoI、SphI 部位を有し内部に SmaI、Asp718(KpnI) 部位を有する断片

(配列 12、13)

5'-TCGAGCCCCGGGGTACCGCATG-3'

5'-CGGTACCCCCGGGC-3'

を挿入して、転写制御領域挿入用ルシフェラーゼレポーターベクター pSE0luc2 を造成した。

【0076】

次に P53 応答配列を内部に有する互いに相補的な下記の 2 本のオリゴヌクレ

オチド（配列 14、15）

5'-TCGAGGGACTTGCCTGGACTTGCCTGTCGACG-3'

5'-GTACCGTCGACAGGCAAGTCCAGGCAAGTCCC-3'

をアニーリングさせ、上で造成したルシフェラーゼベクター pSE0luc2 の XhoI, Asp718 部位に挿入し、転写制御領域に P53 応答配列を 1 コピー有するレポータープラスミド p53RE1luc2 を造成した。

【0077】

この p53RE1luc2 を制限酵素 XhoI, MluI で同時に切断し、アガロースゲル電気泳動で分離することで、5.3 kb からなる XhoI-MluI DNA 断片を得た。また、同じく p53RE1luc2 を制限酵素 SalI, MluI で同時に切断し 2.6 kb からなる MluI-SalI DNA 断片を得た。この両断片をライゲーションすることで、P53 応答配列を 2 コピー有するレポータープラスミド p53RE2luc2 を造成した（図5参照）。

【0078】

同様に p53RE2luc2 を制限酵素 XhoI, MluI で同時に切断し、アガロースゲル電気泳動で分離することで、5.3 kb からなる XhoI-MluI DNA 断片を得た。また、同じく p53RE2luc2 を制限酵素 SalI, MluI で同時に切断し 2.6 kb からなる MluI-SalI DNA 断片を得た。この両断片をライゲーションすることで、P53 応答配列を 4 コピー有するレポータープラスミド p53RE4luc2 を造成した（図6参照）。

【0079】

得られた p53RE4luc2 に対して上記と同様の方法を繰り返すことにより、P53 応答配列を 8 コピー有するレポータープラスミド p53RE8luc2 を造成した（図7参照）。

【0080】

#### 細胞への DNA と試験化合物の導入

試験化合物の細胞への導入は DNA トランスフェクション用リボソーム試薬 DO SPER<sup>TM</sup>（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた。

ヒト類表皮癌細胞（Human Epidermoid carcinoma）株、A431（American Type

Culture Collection (ATCC, CRL-1555) を  $4 \times 10^5$  個/well の細胞密度で細胞培養用 6 穴ディッシュ (直接 35 mm、岩城硝子社製) にまき、10 % 牛胎児血清 (FBS) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (以後 DMEM-FBS 培地という) 中で、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。24 時間培養後、試験化合物 50 nmol とレポータープラスミド p53RE8luc2、2 µg を緩衝液 (20 mM HEPES、150 mM NaCl、pH 7.4、以後 HBS 緩衝液という) に溶解し、最終容量を 100 µl とした (溶液 A とする)。同じく HBS 緩衝液に 5 µl のドスパー (Dosper) 溶液を加え、最終容量を 100 µl とした (溶液 B とする)。A、B 両溶液を静かに混合し、室温で 15 分間放置後、0.8 ml の Opti-MEM<sup>RI</sup> 培地 (Gibco BRL) を加えた。

【0081】

上記 6 穴ディッシュで培養した A431 細胞の培地を吸引により除き、2 ml の Opti-MEM<sup>RI</sup> 培地 (Gibco BRL) で洗浄した後、上記の方法で調製した A、B 混合液 1 ml を静かに細胞の上に加えた。37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 存在下で、6 時間培養し、さらに 1 ml の DMEM-FBS 培地を加え、さらに 24 時間培養した。試験化合物の最終濃度は 25 µM となる。

【0082】

P53 依存性転写活性の測定

上記細胞を 24 時間培養後、細胞をスクレイパーで剥離し、遠心分離で回収した。細胞を溶解用緩衝液 [1 % Triton X 100, 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8), 1 mM DTT] 0.5 ml に懸濁後、遠心して上清をとり 200 µl を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、10 µl を用いて蛋白質濃度を測定した。ルシフェラーゼ活性の測定はルミノメーター LB953 (ベルトールド社) を用い、基質溶液 [25 mM グリシルグリシン (glycylglycine) (pH 7.8), 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM ATP, 0.33 mM ルシフェリン (luciferin)] 300 µl を自動注入後、10 秒間の発光量を測定し、ルシフェラーゼ活性とした。また、蛋白質濃度は BIO-RAD プロテインアッセイキット (BIO-RAD 社) を用いて測定し、その値を用いてルシフェラーゼ濃度を補正した。また、試験化合物を反応系に含まないサンプルのルシフェラーゼ活性 (蛋白質濃度で補正) を基準に、以下の式にしたがって活性化率を計算した。結果を第 4 表に示す。



【0083】

【表4】

第4表

化合物名	活性化率
化合物 1	1.4
化合物 4	6.3

【0084】

活性化率 =  $B / A$ 

A : 試験化合物非存在下におけるルシフェラーゼ活性 (蛋白質濃度で補正)

B : 試験化合物存在下におけるルシフェラーゼ活性 (蛋白質濃度で補正)

【0085】

試験例 4 A431 細胞に対する増殖阻害活性の測定

DME-FBS 培地中で、37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養したヒト類表皮癌細胞株 A431、 $1 \times 10^6$  個を、50  $\mu$ l の緩衝液 (137 mM KCl, 2.7 mM NaCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>、以後、本緩衝液を K-PBS 緩衝液という) に懸濁し、K-PBS 緩衝液で適宜希釈した試験化合物を最終濃度 100  $\mu$ M になるように加えた。この懸濁液を 0.2 cm 幅のキュベット (BIO-RAD 社) に移し、島津細胞融合装置 SSH-1 (島津製作所製) を用いて (電圧 3 kV/cm、パルス幅 100  $\mu$ s、パルス間隔 1 s、パルス回数 2 回) の条件で電気パルスをかけた。キュベットを 10 分間静置後、細胞を回収して DMEM-FBS 培地に懸濁し、96 穴マイクロタイタープレート (Nunc 社製、#167008) に  $1 \times 10^3$  個/Well になるように細胞を分注した。そこに、終濃度 100  $\mu$ M になるように電気パルスをかけた際に用いたのと同種の試験化合物を加えた。

【0086】

その細胞を 37℃、5% CO<sub>2</sub> 存在下で、6 日間培養した。培養が終了する 3 時間前に、培地を除去し、1 well あたり 100  $\mu$ l の PBS 緩衝液で 1 回洗浄し

た後、DMEM-FBS 培地を 1 well あたり 50  $\mu$ l 加えた。さらに 1 mg/ml の XTT (sodium 3-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzene sulfonic acid hydrate) と 25  $\mu$ M の PMS (N-methyl dibenzopyrazine methylsulfate) を RPMI1640 に溶解させた XTT 標識試薬 (ベーリンガーマンハイム社製) を 1 well あたり 25  $\mu$ l ずつ分注した。培養終了後、マイクロプレートリーダー Model550 (Bio-Rad 社製) で、490 nm の吸光度を測定した。対照波長としては 655 nm を用いた。バックグラウンド (細胞なし) の値を差し引いた後、試験化合物を入れずに電気パルスをかけた場合の吸光度を基準とし、以下の式に従って、増殖阻害率を計算した。結果を第 5 表に示す。

【0087】

【表 5】

第 5 表

化合物名	生育阻害率 (%)
化合物 1	16
化合物 4	50
化合物 6	76

【0088】

阻害率 =  $(A - B) / A \times 100$  (%)

A : 試験化合物非存在下における吸光度 (A490-A655)

B : 試験化合物存在下における吸光度 (A490-A655)

(A490、A655 は 490 nm、655 nm における吸光度をそれぞれ示す)

以下に、本発明の参考例および実施例を示す。

【0089】

【実施例】

以下の参考例および実施例において、化合物の理化学的性質は次の方法により測定した。

質量分析は、日本電子 JMS-SX102A を用い FAB-MS 法により行った。アミノ酸分析は、ビドリングマイヤー (Biddingmeyer, B. A.) らの方法 [ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (Journal of Chromatography), 336 巻, 93 頁 (1984 年)] により行った。加水分解は塩酸蒸気中 110 °C で 22 時間行い、加水分解物のアミノ酸組成はウォーターズ・ピコ・タグ (Waters Pico Tag) アミノ酸分析計 (Waters 社製) を用い分析した。

【0090】

参考例 1 化合物 1 (H-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-OH) の合成

Fmoc-Leu 18  $\mu\text{mol}$  が結合した担体樹脂 (Wang レジン) 30 mg を自動合成機 (島津製作所製 PSSM-8) の反応器に入れ、島津製作所の合成プログラムに従い次の操作を行った。

(a) 担体樹脂を DMF により 3 分間洗浄し、該溶液を排出した。

(b) 30 % ピペリジン-DMF 溶液 755  $\mu\text{l}$  を加えて混合物を 4 分間攪拌し、該溶液を排出し、この操作をもう1回繰り返した。

(c) 担体樹脂を DMF で 1 分間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を 5 回繰り返した。

【0091】

こうして、Fmoc 基を除去した Leu の結合した担体樹脂を得た。

(d) Fmoc-Lys(Boc)-OH 180  $\mu\text{mol}$ 、PyBOP 180  $\mu\text{mol}$ 、HOBt 1 水和物 180  $\mu\text{mol}$  および NMM 270  $\mu\text{mol}$  を DMF 630  $\mu\text{l}$  中で 3 分間攪拌し、得られた溶液を樹脂に加えて混合物を 30 分間攪拌し、溶液を排出した。

(e) 担体樹脂を DMF で 1 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した。こうして、Fmoc-Lys(Boc)-Leu が担体上に合成された。

【0092】

次に、(a) ~ (c) の洗浄、脱保護工程を行った後、(d) の工程で Fmoc-Lys(Boc)-OH を用いて縮合反応を行い、次いで (e) の洗浄工程を経て、Fmoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Leu が担体上に合成された。以下、工程 (d) において、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、F

moc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH を順次用いて、(a) ~ (e) を繰り返し、保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。さらに、(a) ~ (c) の洗浄、脱保護工程を行った後、担体樹脂を DMF で 1 分間洗浄し、これを 5 回繰り返した後、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄後、減圧下 12 時間乾燥して、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。これに、TFA (82.5 %)、チオアニソール (5 %)、水 (5 %)、エチルメチルスルフィド (3 %)、1,2-エタンジチオール (2.5 %) およびチオフェノール (2 %) からなる混合溶液 600  $\mu$ l を加えて室温で 8 時間放置し、側鎖保護基を除去するとともに樹脂よりペプチドを切り出した。樹脂を濾別後、得られた溶液にエーテル約 10 ml を加え、生成した沈澱を遠心分離およびデカンテーションにより回収し、粗ペプチドとして 51.8 mg を取得した。この粗生成物を 2 M 酢酸に溶解後、逆相カラム (資生堂製、CAPCELL PAK C18 30 mm I.D. x 250 mm) を用いた HPLC で精製した。0.1 % TFA 水溶液に、TFA 0.1 % を含む 90 % アセトニトリル水溶液を加えていく直線濃度勾配法で溶出し、220 nm で検出し、標記化合物を含む画分を得た。この画分を凍結乾燥して、化合物 1 を 21.9 mg 得た。

質量分析 FAB-MS: 1726.4 ( $M + H^+$ )

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 2.7 (3), Gly 1.0 (1), His 1.0 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 1.8 (2), Lys 5.2 (5)

【0093】

#### 参考例 2 化合物 2 (H-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-OH) の合成

Fmoc-Lys(Boc) 18.3  $\mu$ mol が結合した担体樹脂 30 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 42.7 mg を取得し、参考例 1 と同様に逆相

カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 2 を 14.1 mg 得た。

質量分析 (FAB-MS)  $m/z$ : 1500.2 ( $M + H^+$ )

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 2.8 (3), Gly 1.0 (1), His 1.0 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Lys 5.1 (5)

【0094】

参考例 3 化合物 3 (H-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-OH) の合成

Fmoc-Lys(Boc) 30.5  $\mu\text{mol}$  が結合した担体樹脂 50 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 54.4 mg を取得し、参考例 1 と同様に逆相カラムを用いた HPLC で精製し、化合物 3 を 41.4 mg 得た。

質量分析 (FAB-MS)  $m/z$ : 1284.6 ( $M + H^+$ )

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 1.9 (2), Gly 1.1 (1), His 1.0 (1), Arg 0.9 (1), Thr 1.0 (1), Lys 3.8 (4)

【0095】

実施例 1 化合物 4 [H-cyclo(Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys)-OH] の合成

Fmoc-Cys(Trt) 25  $\mu\text{mol}$  が結合した担体樹脂 45.4 mg を出発物質とし、ACT 社のペプチド合成機 (ACT357) を用いて、次の操作を行った。

(a) 担体樹脂を DMF 1 ml により 30 秒間洗浄し、該溶液を排出した。

(b) 25 % ピペリジン-DMF 溶液 1 ml を加えて混合物を 2 分間攪拌し、該溶液を排出し、さらに 25 % ピペリジン-DMF 溶液 1 ml を加えて混合物を 10 分間攪拌し、該溶液を排出した。

(c) 担体樹脂を DMF で 12 秒間洗浄し、該溶液を排出し、この操作を 7 回繰り返した。

【0096】

こうして、Fmoc基を除去したCys(Trt)の結合した担体樹脂を得た。

(d) DMF 125  $\mu$ l、Fmoc-Leu-OH と HOBt 1 水和物とをそれぞれ 0.25 M の濃度で含む NMP 溶液 500  $\mu$ l、PyBOPを 0.25 M の濃度で含む DMF 溶液 500  $\mu$ l、および NMM を 2.0 M の濃度で含む DMF 溶液 125  $\mu$ l を樹脂に加えて 60 分間攪拌し、溶液を排出した。

(e) 反応容器を 500  $\mu$ l のDMFで洗浄後、1 ml の DMF で 30 秒間洗浄し、さらに再度 500  $\mu$ l の DMF で洗浄した。こうして、Fmoc-Leu-Cys(Trt) が担体上に合成された。

【0097】

次に、(a) ~ (c) の洗浄、脱保護工程を行った後、(d) の工程で Fmoc-Leu-OH に代わり Fmoc-Lys(Boc)-OH を含む溶液を用いて縮合反応を行い、次いで (e) の洗浄工程を経て、Fmoc-Lys(Boc)-Leu-Cys(Trt) が担体上に合成された。以下、工程 (d) において、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Thr(t-Bu)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(t-Bu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂 145.1 mg を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 68.5 mg を取得した。これを、3ml の DMF に溶解し、pH 9.5 の希アンモニア水 1 ml を加えて室温で 30 分間放置した。これを、参考例 1 と同様に逆相カラム (YMC 製、YMC-Pack ODS-AM 30 mm I.D.x 250 mm) を用いた HPLC で精製し、化合物 4 を 12.7 mg 得た。

質量分析 (FAB-MS) m/z: 1930.1 (M + H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析: Glx 1.0 (1), Ser 3.0 (3), Gly 1.1 (1), His 1.1 (1), Arg 1.1 (1), Thr 1.0 (1), Leu 1.7 (2), Lys 5.0 (5), Cys 2.0 (2)

【0098】

実施例 2 化合物 5 [cyclo (Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu)] の合成

Cl 基が 160  $\mu\text{mol}$  結合した 2-chlorotritylchloride 樹脂 (島津製作所製) 100 mg に 80  $\mu\text{mol}$  の Fmoc-Leu-OH を 200  $\mu\text{l}$  の DMF に溶解した後 1 ml の DCM で希釈した溶液および 10.1  $\mu\text{l}$  の DIEA を加えて室温で 5 分間攪拌した。さらに 20.3  $\mu\text{l}$  の DIEA と 20.3  $\mu\text{l}$  の DCM を加えて室温で 45 分間攪拌した後、53.3  $\mu\text{l}$  のメタノールを加えて 10 分間攪拌した。樹脂を濾別後 DCM、DMF、イソプロパノール、メタノール、ブチルエーテルで順次洗浄し減圧下乾燥させ、Fmoc-Leu-2-chlorotritylchloride 樹脂を得た。この樹脂のうち 40 mg (理論上 32  $\mu\text{mol}$  の Fmoc-Leu が結合している) に、5 % ピペリジンを含む DMF/DCM の 1/1 溶液を加えて 10 分間放置後溶液を排出し、その後参考例 1 と同様にして、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。ただし、アミノ酸の縮合時間は 40 分間とした。樹脂からの切り出しを、酢酸 20 %、TFE 20 %、DCM 60 % の混合液を 0.8 ml 使用し放置時間を 2 時間とする以外は参考例 1 と同様に行い、側鎖保護基の付いた粗ペプチド 63.8 mg を取得した。

質量分析 (FAB-MS)  $m/z$ : 3704.9 ( $M + H^+$ )

得られた粗ペプチドに 5 % TFA、5 % TFE、5 % トリイソプロピルシラン、85 % DCM の混合液 1 ml を加え室温で 5 分間放置後、参考例 1 と同様にエーテルを加えて生成する沈殿を回収し、Ser、Thr の側鎖 Trt 基のみを除去した粗ペプチド 59.8 mg を得た。

【0099】

このうちの 30 mg を 30 ml の DMF に溶解後、16.6 mg の PyBOP、4.9 mg の HOBt 1 水和物、5.3  $\mu\text{l}$  の NMM を加え、4  $^{\circ}\text{C}$  で 18 時間攪拌し、減圧下溶媒を除去した。残さに、TFA (82.5 %)、チオアニソール (5 %)、水 (5 %)、エチルメチルスルフィド (3 %)、1,2-エタンジチオール (2.5 %) およびチオフェノール (2 %) からなる混合溶液 1 ml を加えて室温で 8 時間放置後、参考例 1 と同様にエーテルを加えて生成する沈殿を回収し、粗ペプチド 26.6 mg を得た。

これを参考例 1 と同様に逆相カラム（資生堂製、CAPCELL PAK C18 30 mm I.D. x 250 mm）を用いた HPLC で精製し、化合物 5 を 7.7 mg 得た。

質量分析 (FAB-MS)  $m/z$ : 1708.2 ( $M + H^+$ )

アミノ酸分析: Glx 1.1 (1), Ser 2.8 (3), Gly 1.2 (1), His 1.0 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 1.8 (2), Lys 5.1 (5)

【0100】

実施例 3 化合物 6 [H-cyclo (Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys) -NH<sub>2</sub>] の合成

Fmoc-NH 16.5  $\mu$ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 30 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様に、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH を順次縮合した後に、洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様に側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 35.8 mg を取得した。これを、40 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.7 に調整し、室温で 20 時間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラム（資生堂製 CAPCELL PAK C18 30 mm I.D. x 250 mm）を用いた HPLC で精製し、化合物 6 を 3.5 mg 得た。

質量分析 (FABMS)  $m/z$ : 1931.9 ( $M + H^+$ )

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 2.8 (3), Gly 1.0 (1), His 1.2 (1), Arg 1.1 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.1 (2), Lys 4.9 (5), Cys 2.1 (2)

【0101】

実施例 4 化合物 7 [Ac-cyclo (Cys-Leu-Lys-Ser-Lys-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu-Cys) -NH<sub>2</sub>] の合成

Fmoc-NH 16.5  $\mu$ mol が結合した担体樹脂 (Rink Amide MBHA レジン) 30 mg を出発物質とし、参考例 1 と同様に、Fmoc-Cys (Trt) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Arg (Pmc) -



OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Thr (t-Bu) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Lys(Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Ser (t-Bu) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Cys (Trt) -OH を順次縮合した後に、DMF 495  $\mu$ l および無水酢酸 32.4  $\mu$ l を加え室温で 1 時間攪拌した。洗浄、乾燥を経て、側鎖保護ペプチドの結合した担体樹脂を得た。参考例 1 と同様にして側鎖保護基の切断ならびに樹脂からの切り出しを行い、粗ペプチド 37.1 mg を取得した。これを、40 ml の水に溶解し、希アンモニア水を加えて pH を 7.7 に調整し、室温で 20 時間攪拌した。反応液を、参考例 1 と同様に逆相カラム（資生堂製 CAPCELL PAK C18 30 mm I.D.x 250 mm）を用いた HPLC で精製し、化合物 7 を 4.5 mg 得た。

質量分析 (FABMS) m/z: 1974.0 (M + H<sup>+</sup>)

アミノ酸分析: Glx 0.9 (1), Ser 2.9 (3), Gly 1.0 (1), His 1.2 (1), Arg 1.0 (1), Thr 1.0 (1), Leu 2.0 (2), Lys 4.8 (5), Cys 1.7 (2)

【0102】

【発明の効果】

本発明により変異 P53 蛋白質に直接作用しその DNA 結合活性を増大し転写活性を復活増強させることによる抗腫瘍作用を有する環状構造を持つペプチドおよびその薬理的に許容される塩が提供される。

【0103】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1

5

10

15

【0104】

配列番号：2

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys

1

5

10

【0105】

配列番号：3

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys

1 5 10

【0106】

配列番号：4

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

特平 9-126113

存在位置：1, 17

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Cys

1 5 10 15

【0107】

配列番号：5

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：環状

配列の種類：ペプチド

配列

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

1 5 10 15

【0108】

配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は L-システインアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Xaa

1 5 10 15

【0109】

配列番号：7

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1

他の情報：Xaa は N-アセチル-L-システインを表す

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は L-システインアミドを表す

配列

Xaa Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Xaa

1 5 10 15

【0110】

配列番号：8

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

CTAGACAGCC AGACTGCCTT CCGGGTCACT GC 32

【0111】

配列番号：9

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

CATGGCAGTG ACCCGGAAGG CAGTCTGGCT GT 32

【0112】

配列番号：10

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGAGAGACA TGCCTAGACA TGCCTG 26

【0113】

配列番号：11

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGACAGGCA TGTCTAGGCA TGTCTC 26

【0114】

配列番号：12

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGAGCCCCG GGGTACCGCA TG 22

【0115】

配列番号：13

配列の長さ：14

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

CGGTACCCCC GGGC

【0116】

配列番号：14

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

TCGAGGGACT TGCCTGGACT TGCCTGTCGA CG 32

【0117】

配列番号：15

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTACCGTCGA CAGGCAAGTC CAGGCAAGTC CC

【0118】

配列番号：16

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds



存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：18

他の情報：Xaa は 12-ドデカナミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Cys Xaa

1 5 10 15

【0119】

配列番号：17

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は N-ドデシル-L-システインアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Xaa

1 5 10 15

【0120】

配列番号：18

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

特平 9-126113

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は N-オクタデシル-L-システインアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Xaa

1 5 10 15

【0121】

配列番号：19

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 17

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：14

他の情報：Xaa は N<sup>6</sup>-アセチル-L-リジンを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Xaa Lys Leu Cys

1 5 10 15

【0122】

配列番号：20

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：1, 17

他の情報：存在位置1および17の Xaa はそれぞれメチレンを介して S が結合した L-システインを表す

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：17

他の情報：Xaa は L-システインアミドを表す

配列

Xaa Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Xaa

1 5 10 15

【0123】

配列番号：21

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：両形態

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：cross-links

存在位置：1, 16

他の情報：存在位置1の Lys は N<sup>6</sup> が存在位置16の Leu とアミド結合を形成する Lys を表す

配列

Lys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu

特平 9-126113

1 5 10 15

【0124】

配列番号：22

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：disulfide-bonds

存在位置：1, 8

特徴を表す記号：modified-site

存在位置：16

他の情報：Xaa は L-ロイシンアミドを表す

配列

Cys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Cys Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Xaa

1 5 10 15

【0125】

配列番号：23

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：両形態

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：cross-links

存在位置：1, 8

他の情報：存在位置1のLysはN<sup>6</sup>が存在位置8のAspとアミド結合を形成するLysを表す

特徴を表す記号 : modified-site

存在位置 : 1 6

他の情報 : Xaa は L-ロイシンアミドを表す

配列

Lys Leu Lys Ser Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Xaa

1 5 10 15

【0 1 2 6】

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 1 6

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 両形態

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : cross-links

存在位置 : 7, 1 3

特徴を表す記号 : modified-site

存在位置 : 1 5

他の情報 : Xaa は L-ロイシンアミドを表す

配列

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Xaa

1 5 10 15

【図面の簡単な説明】

【図1】は P53His273 蛋白質を用いたゲルシフト実験の結果を示す。各レーンの上部に用いた試験化合物の種類と濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示した。

【図2】は P53Trp248 蛋白質を用いたゲルシフト実験の結果を示す。各レーンの上部に用いた試験化合物の種類と濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示した。

【図3】は A431 細胞抽出液を用いたゲルシフト実験の結果を示す。各レーンの上部に用いた試験化合物の種類と濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示した。

【図4】レポータープラスミド p53RE1luc2 の造成の概略を示す。略号は以下の意味を表す。PSE: Sv40 初期遺伝子コアプロモーター、SPBG: ウサギ $\beta$ -グロビン遺伝子由来イントロン、ABG: ウサギ $\beta$ -グロビン由来ポリ A 付加シグナル、ASE: Sv40 初期遺伝子由来ポリ A 付加シグナル、Atk: 単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ由来ポリ A 付加シグナル、G418: Tn5 由来 G418/カナマイシン耐性遺伝子、Ptk: 単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼプロモーター、P1: pBR322 由来 P1 プロモーター、Ap: アンピシリン耐性遺伝子、p53RE: p53 応答配列、GC: GC ボックス、TATA: TATA ボックス

【図5】レポータープラスミド p53RE2luc2 の造成の概略を示す。略号は図4と同義である。

【図6】レポータープラスミド p53RE4luc2 の造成の概略を示す。略号は図4と同義である。

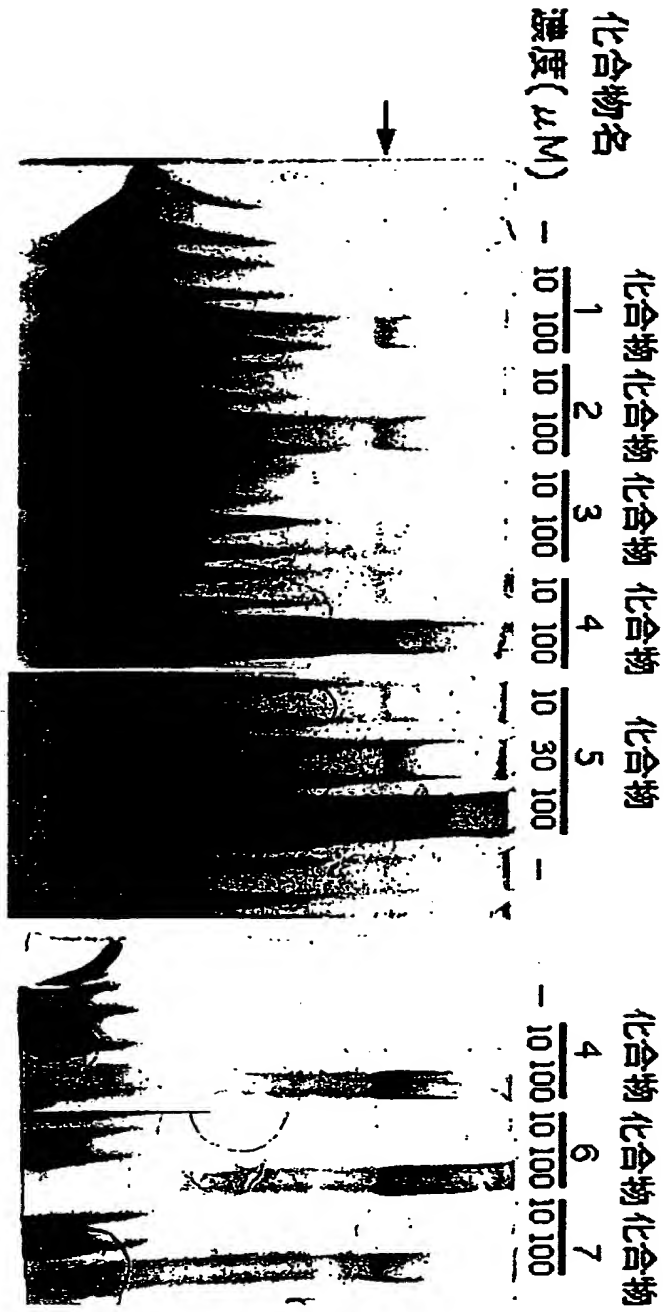
【図7】レポータープラスミド p53RE8luc2 の造成の概略を示す。略号は図4と同義である。

特平 9-1261

【書類名】 図面

【図1】

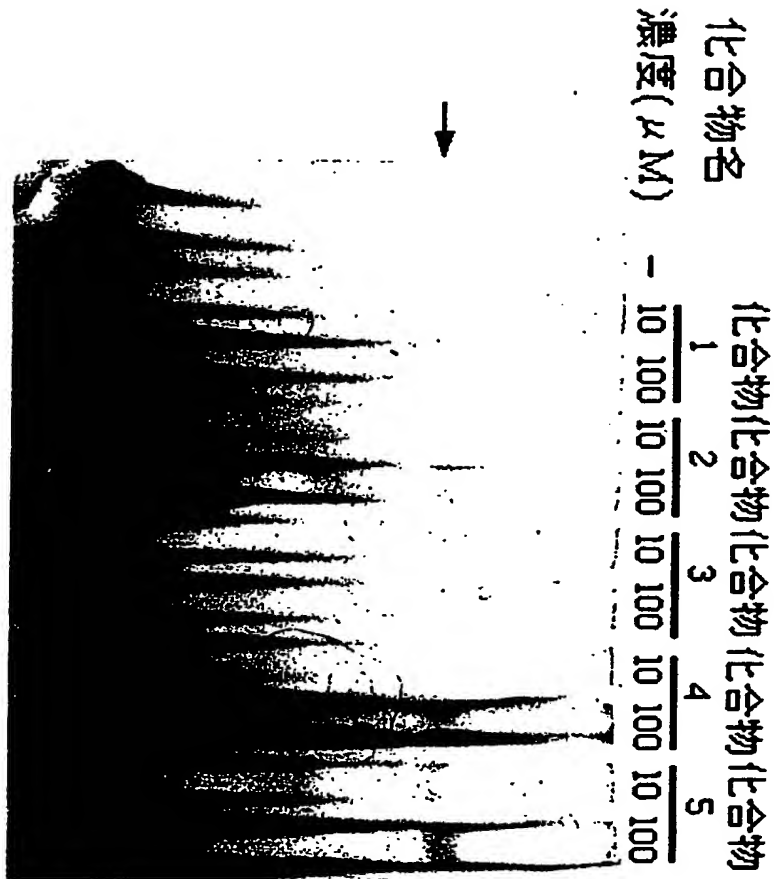
図1





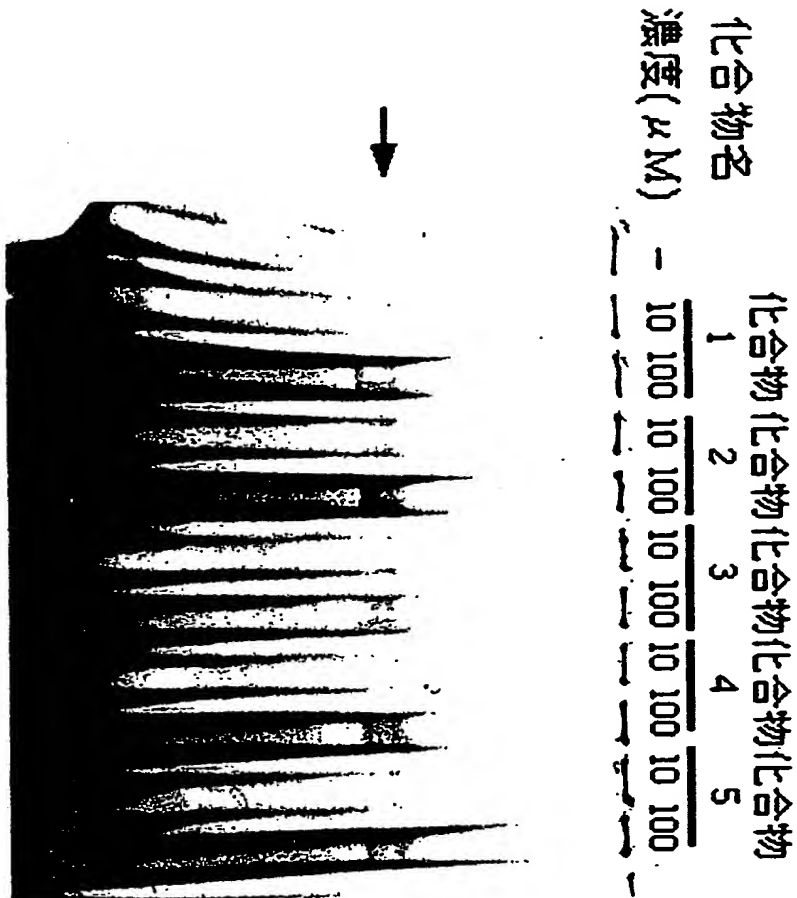
【图2】

图2

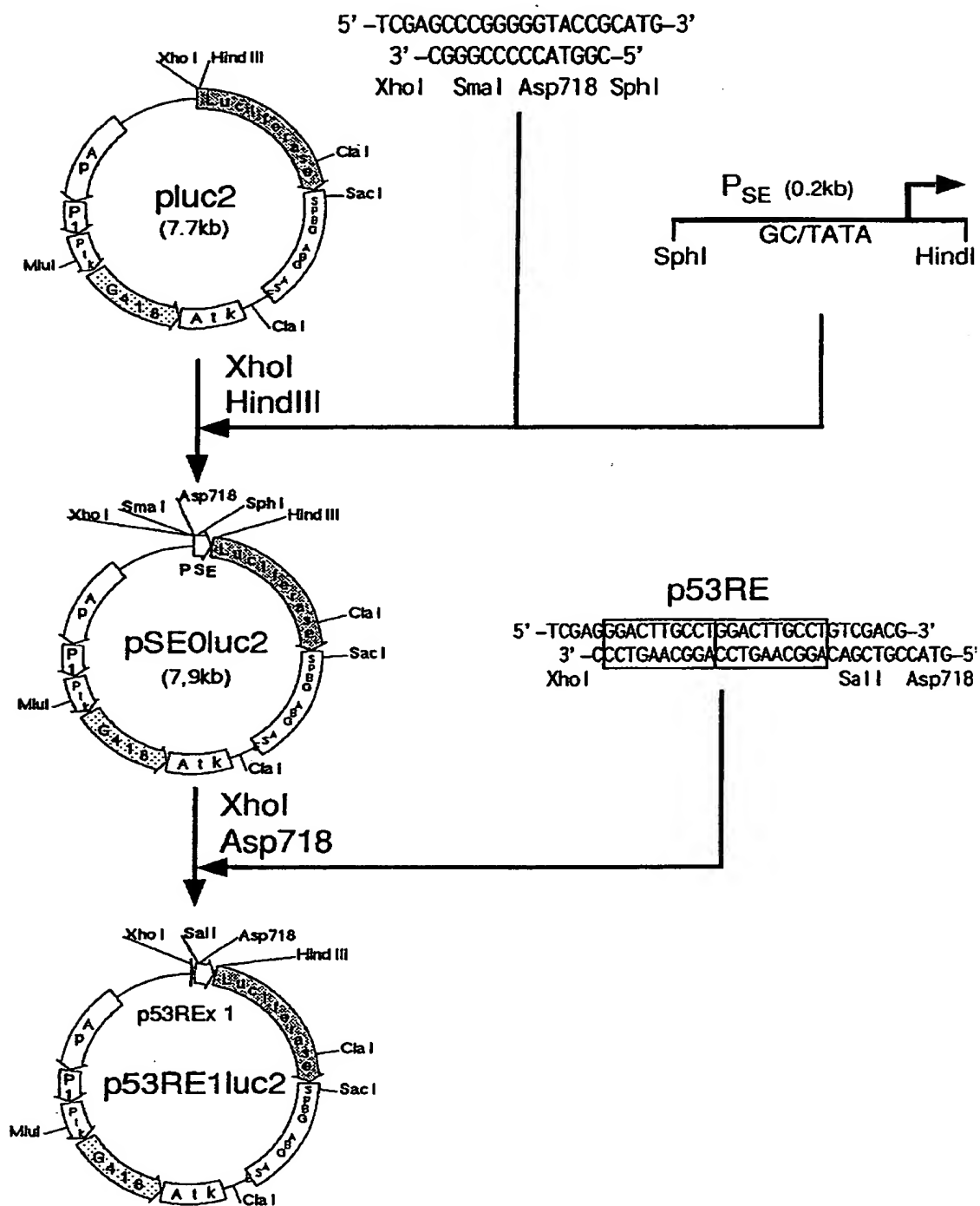


【図3】

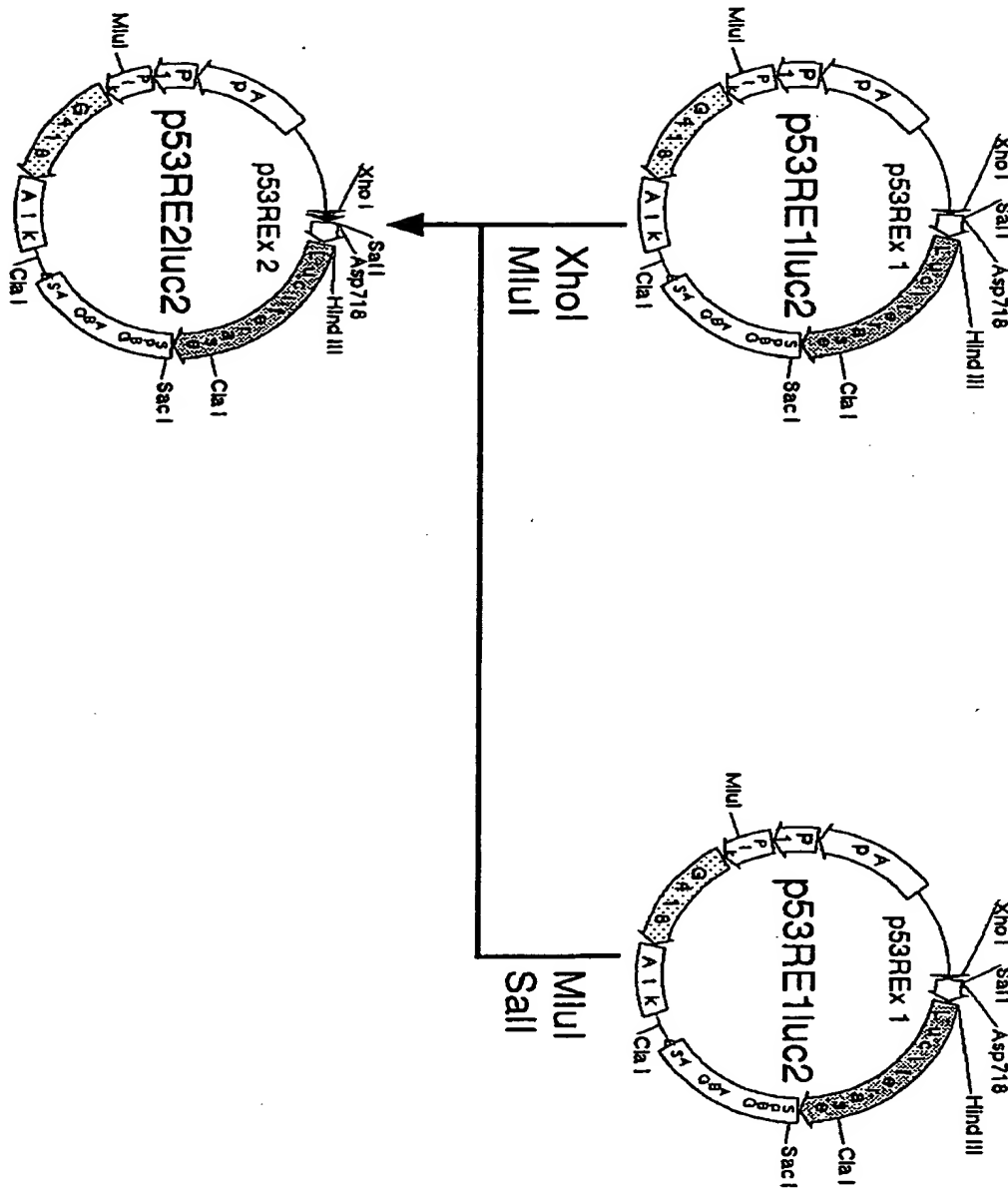
図 3



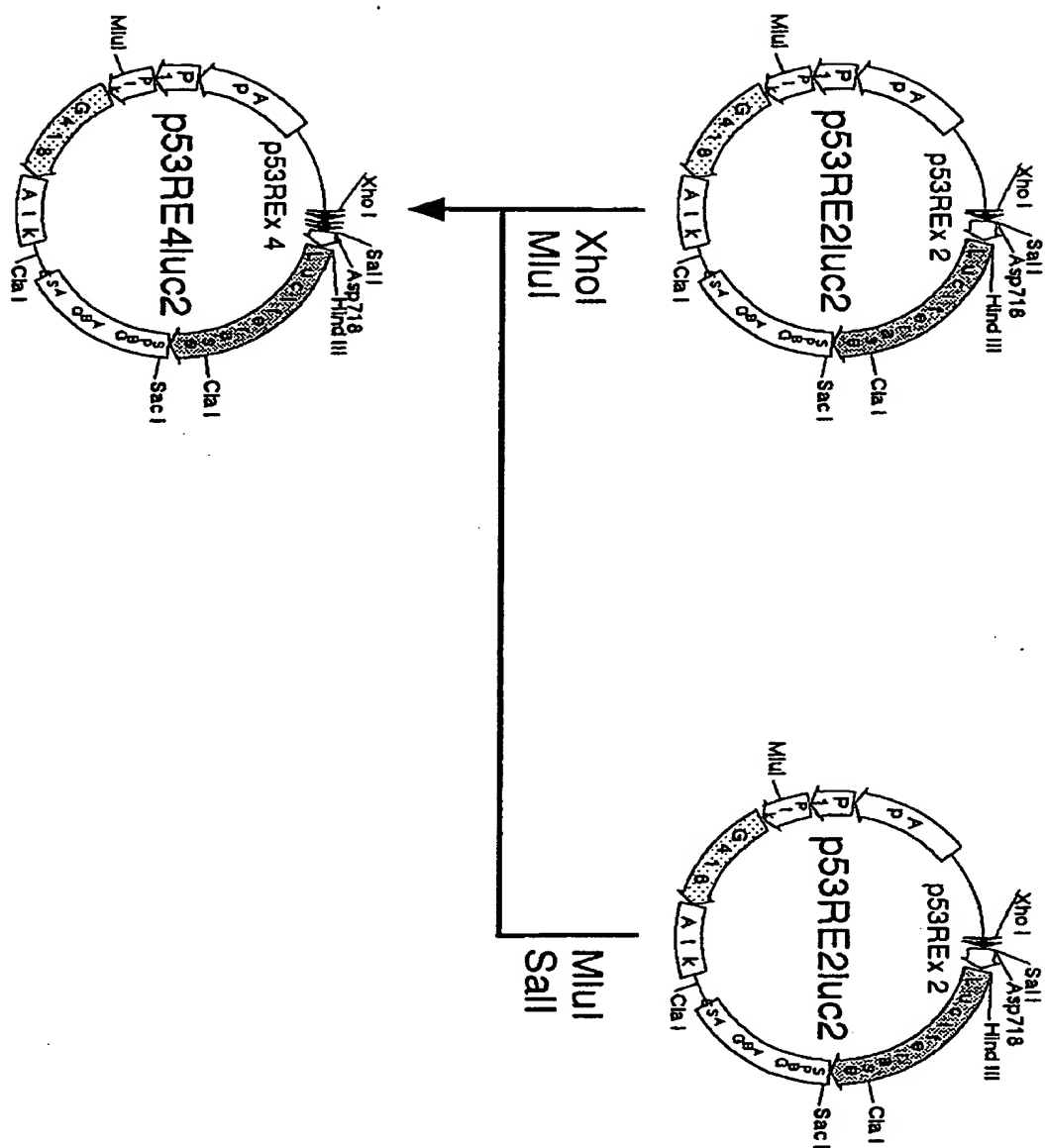
【図4】



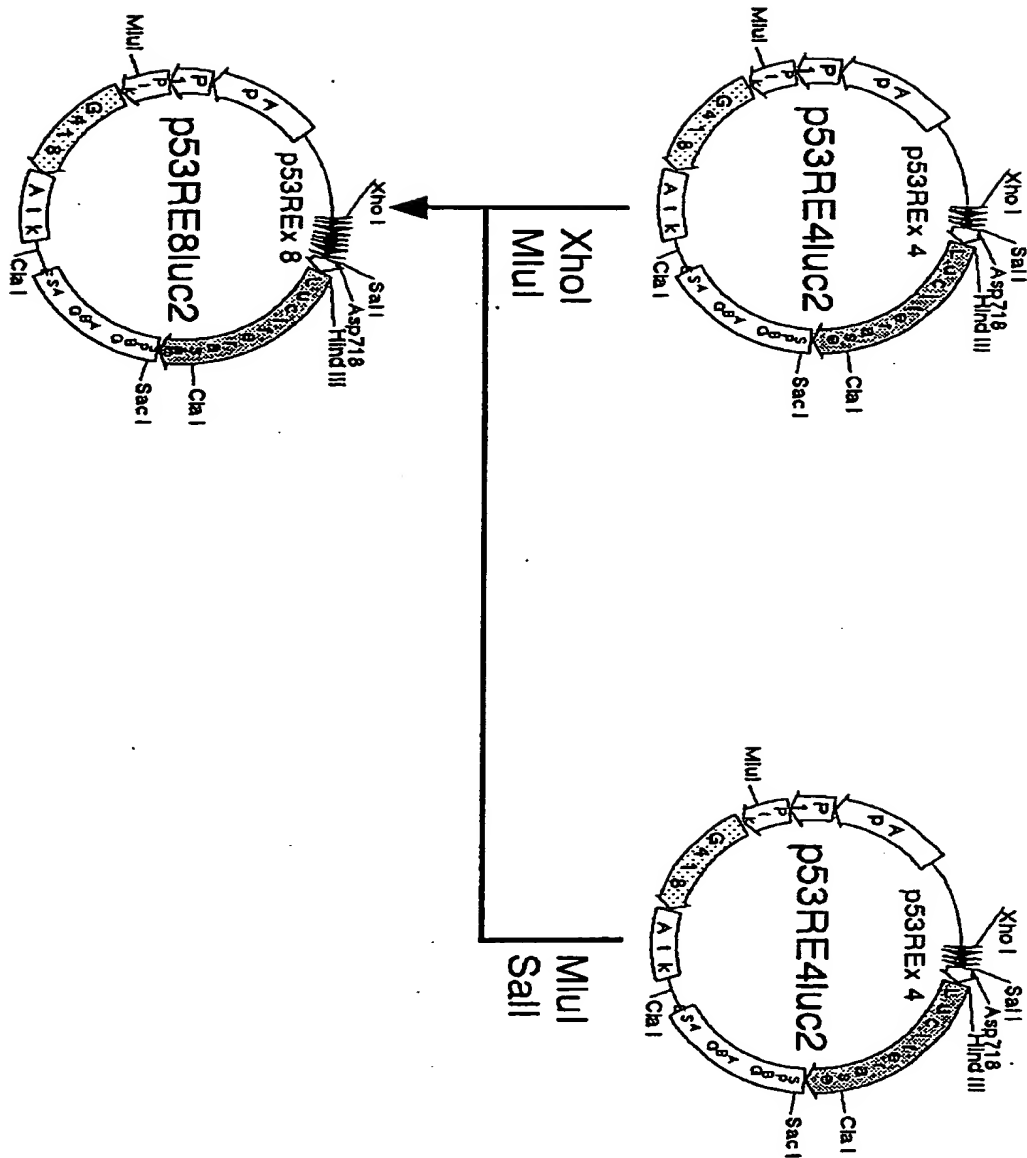
【図5】



【図6】



【図 7】



【書類名】 要約書

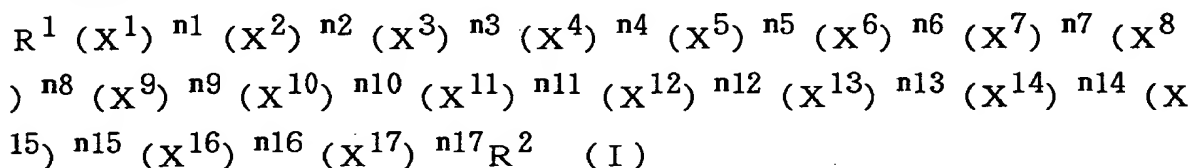
【要約】

【課題】

変異 P53 の特異的 DNA 結合活性を回復させ、それにより P53 依存性の転写活性、増殖抑制活性を回復させることで、単独または既存の化学療法剤との併用で優れた抗腫瘍活性を示す新規ペプチドを提供する。

【解決手段】

一般式 (I)



{式中、 $X^1 \sim X^{17}$ はアミノ酸残基または有機基残基を表す。 $n1 \sim n17$ は0または1を表し、1である当該残基を結合で繋いで配列を表す。1である $n1 \sim n17$ の数は7～17までの中から選ばれる。各配列中、 $X^1 \sim X^{11}$ から選ばれる残基 $X^p$ における1官能基と $X^8 \sim X^{17}$ から選ばれる残基 $X^q$ における1官能基によって環状構造が形成されているものとする(但し、 $p < q$ であり、環状構造における架橋結合はSS、SCH<sub>2</sub>S、CONH、NHCO、OCO、またはCOOから選ばれる)。R<sup>1</sup>は置換もしくは非置換アルカノイル等を、R<sup>2</sup>は置換もしくは非置換アルコキシ等を表す。} で表され、変異 P53 蛋白質の転写活性を復活させる活性を持つ環状構造を持つペプチドまたはその薬理的に許容される塩。

【選択図】 なし

特平 9-126113

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000001029

【住所又は居所】

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

【氏名又は名称】

協和醗酵工業株式会社



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醗酵工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)